
***Optimierung der Isolationsbedingungen osteoarthrotisch
veränderter Chondrozyten***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Alexander Brodhun,

geboren am 12. April 1980 in Jena.

Eisenberg / Thüringen (2008)

Gutachter

1. Prof. Dr. med. R.-A. Venbrocks, Waldkrankenhaus „Rudolf Elle“, Eisenberg
Lehrstuhl für Orthopädie der Friedrich-Schiller-Universität, Jena
2. PD Dr. med. U. Irlenbusch, Orthopädische Klinik, Arnstadt
3. Prof. Dr. med. K.-P. Günther, Klinik für Orthopädie der Uniklinik Carl Gustav Carus,
Dresden

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07. April 2009

1 Abkürzungsverzeichnis

1.1 Abkürzungen

ACT	Autologe Chondrozytentransplantation
AP	Alkalische Phosphatase
Bp	Basenpaare
BD	Beckton Dickinson
cDNA	DNA-Kopie eines RNA-Moleküls (<i>complementary DNA</i>)
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dT	Thymidin
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
GAG	Glykosaminoglykan
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GITC	Guanidiniumisothiocyanat
Gly	Glycin
Koll.	Kollagen
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	Botenribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
OA	Osteoarthrose
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PG	Proteoglykan
PP	Polypropylen
qRT-PCR	Quantitative Real Time PCR
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
SQ	Errechnete Ausgangsmenge von cDNA-Molekülen in der qRT-PCR (<i>Starting Quantity</i>)
Stabw.	Standardabweichung
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (<i>Tris-buffered saline</i>)
Tris	<i>tris</i> -(Hydroxymethyl)aminomethan

v/v	Volumenanteil pro Gesamtvolumen
ZS	Zellsuspension

1.2 Verwendete Einheiten

°C	Grad Celsius
D	Dalton
g	Gramm
l	Liter
m	Meter
min	Minuten
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
s	Sekunde
U	Unit (Enzymeinheit: Substratumsatz/Zeit) [$\mu\text{mol/min}$]

1.3 Präfixe

k	Tausend (Kilo)
m	Tausendstel (Milli)
μ	Millionstel (Mikro)
n	Milliardstel (Nano)

2 Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	I
1.1	Abkürzungen	I
1.2	Verwendete Einheiten	II
1.3	Präfixe	II
2	Inhaltsverzeichnis	III
3	Verzeichnisse	V
3.1	Abbildungsverzeichnis	V
3.2	Tabellenverzeichnis	VII
4	Zusammenfassung	VIII
5	Einleitung	1
5.1	Die Osteoarthritis	1
5.2	Der hyaline Gelenkknorpel	3
5.2.1	<i>Eigenschaften und Funktion</i>	3
5.2.2	<i>Bestandteile</i>	4
5.2.2.1	Chondrozyten	4
5.2.2.2	Extrazelluläre Matrix	5
5.2.3	<i>Struktureller Aufbau des Gelenkknorpels</i>	9
5.2.4	<i>Besonderheiten des Knorpelstoffwechsels</i>	11
5.2.5	<i>Der arthrotisch veränderte Gelenkknorpel</i>	12
5.3	Rolle des Tissue Engineering / ACT	14
5.4	Die Phase der Zellisolation	17
5.4.1	<i>Calcium (Ca^{2+})</i>	18
5.4.2	<i>Phenolrot</i>	19
5.4.3	<i>Hyaluronsäure (HA)</i>	21
5.4.4	<i>Minimalmedium</i>	22
5.5	Problemstellung und Ziel der Arbeit	24
6	Methoden	26
6.1	Medienzusammensetzung	26
6.2	Zellbiologische Methoden	27
6.2.1	<i>Knorpelpräparation</i>	28
6.2.2	<i>Isolation der Chondrozyten aus Knorpelgewebe</i>	29
6.2.3	<i>Bestimmung der Zellzahl</i>	30
6.3	Biochemische Methoden	32

6.3.1	<i>Bestimmung der Alkalischen Phosphatase Aktivität</i>	32
6.4	Molekularbiologische Methoden	32
6.4.1	<i>Isolierung der RNA</i>	32
6.4.1.1	RNA-Isolation aus Chondrozyten (nach Verdau).....	33
6.4.1.2	RNA-Isolation aus Knorpelstück (Nullpunkt)	33
6.4.1.3	Bestimmung der RNA-Konzentration	34
6.4.2	<i>Reverse Transkription</i>	34
6.4.3	<i>Quantitative Real-time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)</i>	36
6.5	Auswertung der gewonnenen Datensätze	41
7	Ergebnisse	42
7.1	Das Ausgangsmaterial (Nullpunktbestimmung)	42
7.2	Der Standardverdau (DMEM)	44
7.3	Modifizierte Verdaubedingungen	49
7.3.1	<i>DMEM/F12 Ca²⁺-haltig vs. DMEM/F12 Ca²⁺-frei</i>	49
7.3.2	<i>DMEM Standard vs. DMEM phenolrotfrei</i>	52
7.3.3	<i>DMEM Standard vs. DMEM Standard + Hyaluronsäure</i>	55
7.3.4	<i>DMEM Standard vs. Minimalmedium</i>	58
8	Diskussion	63
8.1	Das Ausgangsmaterial (Nullpunkte)	64
8.2	Der Standardverdau	65
8.3	Modifizierte Verdaubedingungen	68
8.3.1	<i>DMEM/F12 Ca²⁺-haltig vs. DMEM/F12 Ca²⁺-frei</i>	68
8.3.2	<i>DMEM Standard vs. DMEM Phenolrotfrei</i>	69
8.3.3	<i>DMEM Standard vs. DMEM Standard + Hyaluronsäure</i>	70
8.3.4	<i>DMEM Standard vs. Minimalmedium</i>	71
8.4	Schlussfolgerungen	73
9	Materialien	75
9.1	Laborgeräte und allgemeiner Laborbedarf	75
9.2	Verbrauchsmaterialien	76
9.4	Zellkultur	78
9.5	Lösungen	79
10	Literaturangaben	80
11	Anhang	A

3 Verzeichnisse

3.1 **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Intraoperativer Situs vor Implantation einer Knie-Totalendoprothese (Knie-TEP)	2
Abb. 2: OP-Situs nach Implantation einer bikondylären Knie-TEP	2
Abb. 3: Struktur eines Proteoglykans	8
Abb. 4: Zonale Gliederung hyalinen Knorpels mit schematischer Darstellung des Kollagen- faserverlaufs	9
Abb. 5: OP-Situs im Rahmen einer klassischen ACT	15
Abb. 6: Applikation der Chondrozytensuspension	15
Abb. 7: Struktur von Phenolrot und strukturell verwandter nichtsteroidaler Östrogene	20
Abb. 8: Knorpel-Knochen-Präparat vor Präparation	28
Abb. 9: Präparierte Knorpelschuppen in PBS	28
Abb. 10: Spinner-Flasche auf Magnetrührer	29
Abb. 11: Schema der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	31
Abb. 12: Morphologie eines vitalen und eines avitalen Chondrozyten	31
Abb. 13: Standardkurve und Proben (Koll. Typ I)	37
Abb. 14: Reine Standard-Schmelzkurven (Koll. Typ I)	37
Abb. 15: Standard-Schmelzkurven (Koll. Typ I) mit Artefakt-Schmelzkurven	38
Abb. 16: Schwankungsbreite der mRNA-Genexpressionsprofile im Spenderknorpel vor Verdau (Nullpunkt)	42
Abb. 17: mRNA-Expression der Kollagene Typ I, II, X und der MMP-3 vor Verdau (Nullpunkt), mittels qRT-PCR bestimmt, gegen GAPDH normalisiert	43
Abb. 18: Verhältnisse der mRNA-Expression von Typ-I- zu Typ-II- bzw. Typ-X- zu Typ-II- Kollagen vor Verdau (Nullpunkt)	43
Abb. 19a u. 19b: Streuung der ermittelten Zellzahlen / g verdauten Knorpels in Standard- medium (DMEM)	44
Abb. 20: Vergleich der absoluten mRNA-Expression Nullpunkte zu Standardverdau	46
Abb. 21: GAPDH-normalisierte mRNA-Expression vor und nach Standardverdau	47
Abb. 22: Verhältnisse der mRNA-Expression von Kollagen Typ I bzw. Typ X zu Kollagen Typ II vor und nach Standardverdau	48
Abb. 23: Aktivität der Alkalischen Phosphatase in μ U AP / 100.000 Chondrozyten nach Standardverdau	49

Abb. 24: Zellzahl pro g verdauter Knorpel nach Isolation in Ca^{2+} -haltigem und Ca^{2+} -freiem Medium	50
Abb. 25: Aktivität der AP in $\mu\text{U AP} / 100.000$ isolierte Chondrozyten (Ca^{2+})	50
Abb. 26: Zellzahl pro g verdauter Knorpel nach Isolation in Standard- und phenolrotfreiem Medium	52
Abb. 27: Aktivität der AP in $\mu\text{U AP} / 100.000$ isolierte Chondrozyten (Phenolrot)	53
Abb. 28: GAPDH-normalisierte mRNA-Expression zum Punkt Null, nach Standardextraktion und nach Verdau in phenolrotfreiem Medium	55
Abb. 29: Zellzahl pro g verdauter Knorpel nach Isolation in Standard- und Standardmedium mit Zusatz von HA	56
Abb. 30: Aktivität der AP in $\mu\text{U AP} / 100.000$ isolierte Chondrozyten (HA)	57
Abb. 31: Zellzahl pro g verdauter Knorpel nach Isolation in Standardmedium und Minimalmedium	59
Abb. 32: Aktivität der AP in $\mu\text{U AP} / 100.000$ isolierte Chondrozyten (Minimalmedium)	59
Abb. 33: mRNA-Expression zum Punkt Null, nach Standardverdau und nach Isolation in Minimalmedium	60
Abb. 34: GAPDH-normalisierte mRNA-Expression zum Punkt Null, nach Standardextraktion und nach Verdau in Minimalmedium	61
Abb. 35: Verhältnisse der mRNA-Expression von Kollagen Typ I bzw. Typ X zu Kollagen Typ II vor Verdau sowie nach Standard- und Verdau in Minimalmedium	62

3.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zusammensetzung der Verdaumedien.....	26
Tab. 2: Komponenten der Reverse Transkriptase Reaktion	35
Tab. 3: Zusammensetzung qRT-PCR Ansatz	39
Tab. 4: Auflistung der für die qRT-PCR verwendeten Primerpaare	39
Tab. 5: qRT-PCR Protokoll	40
Tab. 6: Verhältnis der Expression ausgewählter Gene von Chondrozyten nach Standardverdau im Vergleich zum Punkt Null der Isolation	45
Tab. 7: Verhältnis der bezüglich GAPDH und Kollagen Typ II relativierten Expression aus- gewählter Gene (Kollagen I, II, X und MMP-3), Nullpunkt zu nach Standardverdau.....	48
Tab. 8: Verhältnis der absoluten Expression ausgewählter Gene von Chondrozyten, Ca^{2+} -freier vs. Ca^{2+} -haltiger Verdau	51
Tab. 9: Verhältnis der bezüglich GAPDH und Kollagen Typ II relativierten Expression ausgewählter Gene, Ca^{2+} -frei / Ca^{2+} -haltig	51
Tab. 10: Verhältnis der absoluten Expression ausgewählter Gene von Chondrozyten, phenolrotfreier Verdau vs. Verdau in Standardmedium	54
Tab. 11: Verhältnis der bezüglich GAPDH und Kollagen Typ II relativierten Expression ausgewählter Gene, phenolrotfreier Verdau / Standard	54
Tab. 12: Verhältnis der absoluten Expression ausgewählter Gene von Chondrozyten, Standardmedium + HA vs. Standardmedium	57
Tab. 13: Verhältnis der bezüglich GAPDH und Kollagen Typ II relativierten Expression ausgewählter Gene, Standardmedium + HA / Standardmedium	58
Tab. 14: Verhältnis der absoluten Expression ausgewählter Gene von Chondrozyten, Minimalmedium-Verdau vs. Standardmedium.....	61
Tab. 15: Verhältnis der bezüglich GAPDH und Kollagen Typ II relativierten Expression ausgewählter Gene, Minimalmedium / Standardmedium.....	62

4 Zusammenfassung

Die kurative Behandlung chondraler und osteochondraler Defekte stellt eine besondere Herausforderung dar, weil hyaliner Gelenkknorpel nur ein eingeschränktes Regenerationspotential aufweist. Neue Entwicklungen im Bereich von Tissue Engineering, autologer Chondrozytentransplantation (ACT) sowie Trägermatrixproduktion ermöglichen heute allerdings auch die Behandlung von ausgedehnten Knorpel-(Knochen) Defekten bzw. die Ausweitung der Indikationsstellung auf die häufigen früharthrotischen Knorpelschäden. In der Osteoarthritis (OA) zeigen die Chondrozyten massive Veränderungen und weisen gelenkknorpeluntypische Stoffwechselleistungen auf. Ähnliche, unerwünschte Veränderungen treten bei der enzymatischen Isolierung von Chondrozyten aus Knorpelgewebe auf bzw. in der anschließenden Kulturphase. Bisher gibt es jedoch keine optimierten Verfahren, um diese Veränderungen zu minimieren und damit Zellen in der für die ACT benötigten Differenzierung und Qualität bereitzustellen.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand daher einerseits die phänotypische bzw. funktionelle Charakterisierung von Chondrozyten im nativen, resezierten Gelenkknorpel von OA-Patienten und andererseits die Analyse der zellulären Vorgänge während der enzymatischen Gewinnung von Knorpelzellen aus diesem Gewebe. Erstmals wurde über Modifikationen des zum Verdau eingesetzten Mediums eine gezielte Optimierung des Zellverhaltens bereits in der Verdauphase erprobt, d.h. bereits vor Anlegen der Expansionskultur. Neben einem calciumfreien Ansatz und einem glukosereduzierten Ansatz wurde dabei der Zusatz von Hyaluronsäure (HA) sowie der Einfluss von Phenolrot als Bestandteil des Standard-Verdaumediums (DMEM) näher untersucht.

Mittels quantitativer Real-Time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) wurde das Genexpressionsprofil der Zellen jeweils vor und nach der enzymatischen Isolierung aus dem Gewebeverband analysiert. Es wurde sowohl das für Gelenkknorpelzellen typische Markergen Kollagen Typ II als auch die Kollagene vom Typ I bzw. X als Marker für unerwünschte Dedifferenzierungs- bzw. Hypertrophieeffekte analysiert. Zudem wurde die Expression der Matrixmetalloproteinase 3 (MMP-3) als Parameter für den Zellkatabolismus und die Aktivität der Alkalischen Phosphatase (AP) als weiterer Hypertrophiemarker untersucht (Chemilumineszenztest). Letztlich wurde die Anzahl der unter den verschiedenen Versuchsbedingungen gewonnenen Zellen als weiteres Qualitätskriterium berücksichtigt.

Bei makroskopisch vergleichbarer, guter Knorpelqualität zeigten sich im Ausgangsgewebe deutliche interindividuelle Unterschiede (mehrere Zehnerpotenzen) bezüglich der quantitativen mRNA-Expression. Interessanterweise war die mRNA-Expression für alle untersuchten Gene im Anschluss an die Isolation der Zellen in DMEM im Vergleich zum Herkunftsgewebe um ein Vielfaches und signifikant gesteigert. Eine Zellausbeute von durchschnittlich $4,2 \times 10^6$ vitalen Zellen pro g Knorpelnassgewicht, die durch die meisten Versuchsansätze nicht signifikant verändert wurde, belegte ein im Vergleich mit bisher publizierten Daten sehr effektives Standardprotokoll.

Der calciumfreie Verdauansatz bzw. der Zusatz von HA (1 mg/ml) hatten keinen statistisch signifikanten Einfluß auf die mRNA-Expression oder die Aktivität der AP.

Beim Einsatz von Medium ohne den pH-abhängigen Indikatorfarbstoff Phenolrot, der eine Affinität zu den auf Chondrozyten exprimierten α - und β -Östrogenrezeptoren besitzt, war im Vergleich zum phenolrothaltigen Versuchsansatz insbesondere die Expression des Differenzierungsmarkers Kollagen Typ I und des Katabolismusindikators MMP-3 signifikant erhöht. Im Umkehrschluss scheint also die Anwesenheit von Phenolrot während der Isolationsphase den gelenkknorpeltypischen Phänotyp zu stabilisieren.

Bei Verwendung eines glukosereduzierten Minimalmediums (0,1g Glukose/l; Simulation der bradytrophen metabolischen Situation *in situ*) zeigte sich zwar eine im Vergleich zum Standardmedium signifikante Reduktion der Zellausbeuten um etwa 25%, allerdings fiel die Steigerung der AP-Aktivität und die mRNA-Expression aller analysierten Kollagentypen im Vergleich zum Ausgangsgewebe wesentlich bzw. statistisch signifikant niedriger aus als bei der Zellisolation im Standardmedium. Da ein Vitalitätsverlust der Zellen angesichts der gleichbleibend hohen MMP-3-Genexpression unwahrscheinlich ist, vermindert der glukosereduzierte Ansatz möglicherweise die verdaubedingten Alterationen der Zellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass trotz makroskopisch vergleichbarer Knorpelqualität im Arthroseknorpel deutliche interindividuelle Unterschiede in der metabolischen Ausgangslage der extrahierten Zellen bestehen. Die Daten belegen außerdem, dass bereits die Phase der Zellisolation deutliche Auswirkungen auf den chondrozytenspezifischen Stoffwechsel hat und den Knorpelzellphänotyp beeinflusst.

Vorbehaltlich einer Bestätigung in der anschließenden Kulturphase wurden der Zusatz von Phenolrot bzw. die Verwendung eines Minimalmediums als interessante Ansätze definiert, um die Veränderungen der Chondrozyten bei der Isolierung aus dem Gewebe zu minimieren und damit geeignete Zellen für therapeutische Maßnahmen wie die ACT zu gewinnen.

5 Einleitung

5.1 Die Osteoarthritis

Die humane Osteoarthritis ist eine chronisch-degenerative Gelenkerkrankung und aufgrund ihrer hohen Inzidenz von großer sozialmedizinischer Bedeutung. Sie ist morphologisch charakterisiert durch den oftmals flächigen Verlust artikulären Knorpels, eine röntgenologisch damit verbundene Schmälerung des Gelenkspaltes, Umbauvorgänge im Bereich des subchondralen Knochens und die Bildung so genannter Osteophyten.

Bereits um das 40. Lebensjahr sind bei der Hälfte der Bevölkerung röntgenmorphologisch degenerative Gelenkveränderungen erkennbar und mit Erreichen des 65. Lebensjahres ist nahezu jeder Mensch betroffen. Den degenerativen Erkrankungen der Wirbelsäule folgend, ist hierbei das Kniegelenk vor Schulter- und Hüftgelenk am zweithäufigsten betroffen (Niethard und Pfeil 2005).

Abgesehen von den primären Arthrosen, welchen eine ursächlich nicht näher bekannte Knorpelminderwertigkeit zugrunde liegt, gibt es eine Vielzahl von Auslösern, die zur Entwicklung einer sekundären Arthritis führen können. Neben Knorpelschäden aufgrund chronischer Überlastung (z.B. durch Achsfehlstellungen), metabolischer Erkrankungen (z.B. Gicht) oder entzündlicher Gelenkprozesse hat gerade auch die zunehmende sportliche Aktivität der Bevölkerung und die Verbreitung von Risikosportarten beim Freizeitsportler zu einem demographischen Anstieg von prädisponierenden Kniegelenksläsionen geführt (Englund et al. 2003, Gelber et al. 2000, Roos et al. 1995).

Aufgrund der nur eingeschränkten Behandlungsmöglichkeiten münden diese Verletzungen insbesondere bei großflächigem Schaden in einer Vielzahl der Fälle in eine ausgedehnte frühzeitige Arthritis, welche derzeit langfristig nahezu unausweichlich den künstlichen Gelenkersatz (Endoprothese) zur Folge hat. Gerade wegen der hohen Inzidenz an Knorpelschäden aber auch in Hinblick auf die stetig steigende durchschnittliche Lebenserwartung der Bevölkerung ist die finanzielle Belastung der Kostenträger durch die nachfolgenden Arthrosen beträchtlich. Im Jahr 2004 zeichneten sie allein für ca. 3,0 % (6,769 Milliarden Euro) der Krankheitskosten der Bundesrepublik Deutschland verantwortlich (Böhm et al. 2006). So wurden circa 235.000 Patient(Inn)en aufgrund einer Gon- oder Koxarthrose stationär behandelt (Statistisches Bundesamt 2006) und schätzungsweise allein 50.000 Kniegelenksendoprotheseoperationen in Deutschland durchgeführt (Wildner et al. 2000).

Vor allem bei jüngeren, aktiven Patienten ist die Entwicklung einer vorzeitigen Arthrose sehr problematisch. Das Risiko eines vorzeitigen Gelenkverschleißes mit einem Knorpelschaden in der Anamnese ist gegenüber der Durchschnittsbevölkerung um den Faktor drei erhöht (Messner und Maletius 1996), die Langzeitergebnisse der Behandlung mit Kunstgelenken (s. Abb. 1 und 2) in diesem Kollektiv aber bezüglich der Lockerungshäufigkeit schlecht und die mit dem Eingriff einhergehenden Verluste an Lebensqualität meist hoch (Rand und Ilstrup 1991). Auch und gerade für diese Patientengruppe müssen daher effektive, möglichst wenig invasive Therapiealternativen entwickelt werden, die eine schnelle und möglichst dauerhafte Rehabilitation ermöglichen.

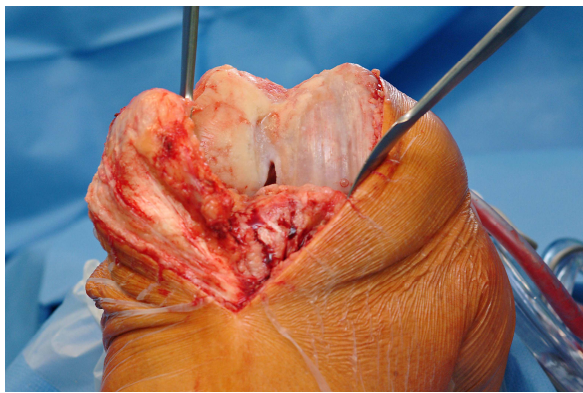


Abb. 1: Intraoperativer Situs vor Implantation einer Knie-Totalendoprothese (Knie-TEP); „Knorpelglätze“ mit deutlich erkennbaren Schleifspuren im Bereich des medialen Femurkondylus

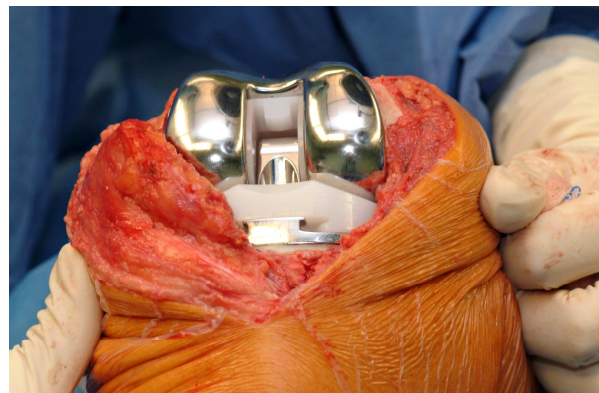


Abb. 2: OP-Situs nach Implantation einer bikondylären Knie-TEP

(Bilder mit freundl. Genehmigung von H. Hauk, Waldkrankenhaus „Rudolf Elle“ gGmbH Eisenberg mit Lehrstuhl für Orthopädie der Friedrich-Schiller Universität Jena)

Mit dem Tissue Engineering, also der in-vitro-Herstellung von Ersatzorganen und -geweben hat sich im Laufe der letzten Jahre ein viel versprechendes Forschungsgebiet entwickelt, das insbesondere auch in der Therapie degenerativer Erkrankungen neue Möglichkeiten eröffnet. So ist zum Beispiel die Autologe Chondrozytentransplantation (ACT) ein Verfahren, welches sich bereits seit einigen Jahren im klinischen Einsatz befindet. 1987 erstmals bei Patienten eingesetzt (Brittberg et al. 1994), bringt die ACT bei der Behandlung von Knorpeldefekten gute bis sehr gute Ergebnisse hervor (Minas 2001, Peterson et al. 2000, Peterson et al. 2002) - dies allerdings bei einer bisher sehr engen Indikationsstellung, in deren Rahmen das Vorhandensein osteoarthrotischer Veränderungen derzeit noch einem Ausschlusskriterium entspricht (Behrens et al. 2004).

Ein umfassendes Verständnis der im Knorpelgewebe ablaufenden physiologischen und pathophysiologischen Vorgänge sowie die Entwicklung neuer Ansätze und Methoden im Bereich des Tissue Engineering sind daher Voraussetzungen für den Fortschritt und die Verbesserung der bestehenden kurativen Behandlungsmöglichkeiten.

5.2 Der hyaline Gelenkknorpel

5.2.1 Eigenschaften und Funktion

Knorpel ist ein druckfestes, wasserreiches Stützgewebe, bei welchem je nach Beschaffenheit der Interzellulärsubstanz die drei Typen: elastischer Knorpel, Faser- o. Bindegewebsknorpel und hyaliner Knorpel unterschieden werden.

Hyaliner Knorpel findet sich außer am sternalen Rippenanteil, den Knorpelspangen der Luftwege und Teilen des Nasenskeletts insbesondere an den artikulierenden Knochenenden synovialer Gelenke. Er überzieht in einer zwischen 0,2 mm (Fingergelenke) und 6,0 mm (Kniegelenk) hohen Schicht die Gelenkoberflächen (Pfander 2005). Intakter, hyaliner Gelenkknorpel weist eine enorme Widerstandsfähigkeit gegenüber mechanischer Belastung auf und ermöglicht in Verbindung mit der Synovia (Gelenkschmiere) bei sehr geringer Reibung schnelle, kaum Scherkräfte erzeugende Bewegungen zwischen den Knochen. Er absorbiert übertragene Kräfte und schützt so den darunter liegenden (subchondralen) Knochen. Nicht zuletzt gewährleistet er aufgrund seiner Beschaffenheit den Ausgleich kleinerer Unebenheiten und somit durch die Kongruenz der korrespondierenden Gelenkflächen die Stabilität des Gelenkes. Seine einzigartige Architektur ermöglicht eine hervorragende Anpassung an die im Gelenkbereich auftretenden, zum Teil sehr starken Kräfte (Buckwalter 2002, Radin und Simon 2001, Sledge et al. 2001).

Die Abwesenheit von vaskulärer, lymphatischer und nervaler Versorgung ist eine weitere Besonderheit des adulten, hyalinen Gelenkknorpels. Sie wird auch mit seinem mangelhaften Regenerationspotential und der Unfähigkeit, selbst kleinste Defekte zu heilen, in Verbindung gebracht. Insbesondere bei der Reaktion auf Verletzungen zeigen sich deutliche Unterschiede zu vaskularisierten Geweben. So kommt es hier zum Beispiel aufgrund der mangelnden Blutversorgung nicht zur klassischen dreiphasigen Wundheilung mit Latenz-, Proliferations- und Reparaturphase (Mankin 1982). Lediglich bei Penetration der subchondralen Knochenplatte findet ein ähnlicher Prozess statt. Hier kann es durch Anschluss an das Gefäßsystem zur Bildung eines minderwertigen Ersatzgewebes (Faserknorpel) kommen, welches aber weder histologisch noch funktionell dem ursprünglichen hyalinen Knorpel entspricht. Es kann die

erforderlichen mechanischen Ansprüche nicht erfüllen und somit eine fortschreitende Gewebedegeneration auch nicht dauerhaft verhindern.

5.2.2 Bestandteile

Grundsätzlich besteht Knorpel aus den Knorpelzellen (Chondrozyten) und der extrazellulären Matrix (EZM), welche als Hauptbestandteil des Knorpelgewebes auch dessen Eigenschaften weitestgehend bestimmt.

5.2.2.1 Chondrozyten

Chondrozyten stammen von der mesenchymalen Differenzierungslinie ab. Sie sind die einzige Zellart des adulten, hyalinen Knorpels und als solche essentiell für Bildung und Aufrechterhaltung der EZM (Urban 1994). Sie machen beim Erwachsenen lediglich ca. 0,4 bis 5 % des Gesamtgewebesvolumens aus und unterscheiden sich je nach Lage in den verschiedenen Knorpelzonen in Form, Größe und vermutlich auch in ihrer metabolischen Aktivität.

Knorpelzellen sind hoch spezialisiert sowohl in der Synthese von Matrix-Komponenten als auch in der Synthese von Enzymen (z.B. Kollagenasen, Kathepsine), die für deren Abbau nötig sind (Sledge et al. 2001). Durch angepasste Syntheseleistung wird die Matrix in Menge und Zusammensetzung reguliert und die in ihrer Lebensdauer begrenzten Makromoleküle werden fortwährend je nach Bedarf ersetzt.

Typischerweise existieren Knorpelzellen in relativer Isolation, liegen allein oder in kleinen Gruppen (Cluster) in so genannten Chondronen - den Knorpelzellnestern mit fibrillenfreier Grundsubstanz. Da kein direkter Kontakt zwischen den einzelnen Zellen besteht, findet die Kommunikation auf anderen Wegen über die EZM und die interstitielle Flüssigkeit statt (Heinegard et al. 2001). Neben der Reaktion auf mechanische Stimuli, werden die Synthese- und Proliferationsfunktionen durch eine Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren reguliert. So können einige Wachstumsfaktoren wie IGF-1 (insulinlike growth factor-1) oder TGF- β (transforming growth factor- β) von den Knorpelzellen selbst synthetisiert werden und wirken autokrin (van den Berg et al. 2001). Integrine, eine große Familie von Signaltransduktions-Proteinen auf der Zelloberfläche, die in die Zell-Matrix-Kommunikation eingebunden sind, wurden für Chondrozyten ebenso beschrieben wie Hyaluronsäurerezeptoren, denen offenbar eine Hauptrolle beim Aufbau und Stoffwechsel der Knorpelmatrix zukommt (Mollenhauer und Kuettner 1997).

5.2.2.2 Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix ist eine Einheit aus zwei wesentlichen Komponenten: einem wässrigen Anteil und einem strukturellen Anteil aus Makromolekülen charakteristischer Anordnung. Die Hauptbestandteile der EZM sind Wasser (65-80 % des Feuchtgewichtes), Kollagene (10-30 % des Feuchtgewichtes), die Glykosamino- (GAG) und die Proteoglykane (PG), welche 5-10 % des Feuchtgewichtes ausmachen. Form und Stabilität des Knorpels beruhen hauptsächlich auf dem dichten molekularen Netzwerk, welches im Zusammenspiel mit dem wässrigen Matrixanteil die mechanischen Eigenschaften wie Zugfestigkeit und Viskoelastizität des hyalinen Knorpels bestimmt (Mollenhauer und Aurich 2003).

Kollagen

Als die Hauptproteine der EZM tragen die Kollagene als Familie faserförmiger Proteine circa 25 % zum Gesamtprotein von Säugern bei. Grob wird zwischen den Subfamilien der Fibrillen-bildenden und der nicht-fibrillären Kollagene unterschieden.

Der Aufbau der Fibrillen-bildenden Kollagenmoleküle folgt dabei charakteristischen Gesetzmäßigkeiten, die für ihre Struktur und Funktion von entscheidender Bedeutung sind. So ist eine wichtige Eigenschaft des typischen Kollagenmoleküls seine Helikalstruktur, in welcher drei Kollagen-Polypeptidketten (α -Ketten) von ebenfalls helikaler Struktur seilartig zu einer sog. Tripelhelix umeinander gewunden sind.

Häufig stellt Glycin (Gly) dabei fast über die gesamte helikale Länge einer Kollagen- α -Kette jede dritte Aminosäure. Aufgrund der regelmäßig vorkommenden Aminosäuresequenz (Gly-X-Y)_n wird Kollagen daher auch als ein Polymer von Tripeptideinheiten bezeichnet. Da Glycin, mit nur einem Wasserstoff als Seitenkette, die kleinste Aminosäure ist, können sich die α -Ketten sehr dicht aneinander lagern, um so die Kollagen-Superhelix entstehen zu lassen. Die Positionen X und Y können durch beliebige Aminosäuren besetzt sein. Gewöhnlich sind diese aber Prolin und Hydroxyprolin, welche aufgrund ihrer Ringstruktur, ebenso wie durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen die Konfiguration der entstehenden Tripelhelices stabilisieren (Ala-Kokko und Prockop 2001, Löffler 2001, Alberts et al. 2004).

Die in den Zellen synthetisierten und posttranslational modifizierten Tripelhelices werden als so genannte Pro-Formen aus der Zelle geschleust. Nach Abspaltung der N- und C-terminal vorhandenen Propeptide durch spezielle Proteasen bilden sich in der EZM die Kollagenfibrillen aus.

Bislang wurden ca. 25 verschiedenartige Kollagen- α -Ketten beschrieben, die jeweils von wenigstens einem eigenen Gen codiert und in speziellen Geweben in jeweils unterschied-

lichen Genkombinationen exprimiert werden. Im Prinzip wären also über 10.000 Kombinationen verschiedener Tripelhelix-Moleküle (Kollagen Typen) möglich. Nachgewiesen wurden bisher allerdings nur etwa 30 (Eyre 2004).

Die in einem dichten Netzwerk angeordneten Kollagenmoleküle machen mehr als 50 % des Knorpel-Trockengewichtes aus (Eyre 2002). Neben den in geringeren Mengen im Knorpel vorkommenden Kollagen-Typen VI, IX, X und XI macht allein der Typ II zwischen 90 und 95 % des Kollagens aus (Kuettner 1992).

Kollagen Typ II ist ein Homotrimer von drei $\alpha 1(\text{II})$ -Ketten, dessen Fibrillen ein dreidimensionales, gewölbeähnliches Fasergeflecht im Knorpel bilden. An der Knorpeloberfläche sind die Kollagenfibrillen in parallelen Schichten zum Gelenkspalt ausgerichtet, während sie sich in tieferen Schichten senkrecht zum Gelenkspalt orientieren. Eingezwängt in das Netzwerk von Kollagenfasern finden sich große Mengen an Proteoglykanen (Bullough und Goodfellow 1968, Pullig 2003).

Kollagen Typ VI formt insbesondere im Bereich der Chondrone ein dreidimensionales Netzwerk (Poole et al. 1992, Pullig et al. 1999). Da dieser Kollagen-Typ auch in anderen Geweben mit hoher Zugbeanspruchung, z.B. der Gelenkkapsel, vorkommt, wird eine Rolle beim Zusammenhalt des Chondrons und bei dessen Widerstandsfähigkeit gegenüber mechanischer Belastung vermutet.

Die Kollagene vom Typ IX und XI sind eng mit Typ II assoziiert und spielen vermutlich bei der Vernetzung und Synthese der Kollagenfibrillen und damit bei der Stabilisierung des gesamten Netzwerkes eine entscheidende Rolle (Eyre 2004).

Kollagen Typ X ist als Markerprotein hypertropher Chondrozyten von Bedeutung und scheint funktionell mit dem Kalzifizierungsprozess von fetalem Knorpel in der epiphysealen Wachstumsfuge in Verbindung zu stehen (Kielty et al. 1985, Kirsch und von der Mark 1991). In gesundem Knorpel ausschließlich in der Mineralisierungszone zu finden, bildet es keine Fibrillen, sondern ähnlich dem Kollagen Typ VI ein Netzwerk (Mollenhauer und Kuettner 1997). Im adulten Knorpel gilt die zunehmende Synthese von Kollagen Typ X als ein Kennzeichen für die chondrozytäre Hypertrophie im Verlauf der humanen Arthrose (s. auch Kapitel 5.2.5) (Pullig 2003).

Eine besondere Rolle unter den Kollagenen nimmt bei der Arbeit mit Chondrozyten das Kollagen Typ I ein. Im Normalfall kein Bestandteil gesunden hyalinen Knorpels, wird sowohl im Rahmen der Zellkultur als auch im Zusammenhang mit der Osteoarthritis eine steigende Expression und Sekretion von Typ-I-Kollagen mit der zunehmenden Dedifferenzierung von Chondrozyten in Verbindung gebracht (Miosge et al. 2004, Pfander 2005).

Um die chondrogene Stoffwechselaktivität isolierter, in Kultur überführter Chondrozyten beurteilen zu können, wird somit im Allgemeinen das Verhältnis der Kollagen Typ I- und II-Expression bzw. -Sekretion untersucht (s. auch Kapitel 5.3.) (Schneider 2003).

Glykosaminoglykane (GAGs) und Proteoglykane (PGs)

GAGs und PGs machen etwa 25-35% des Knorpel-Trockengewichtes aus. Sie repräsentieren eine Gruppe von komplexen Makromolekülen, die mit dem kollagenen Netzwerk in engem Kontakt stehen. Ihre Halbwertszeit wird je nach Quelle mit einem Zeitraum von Wochen bis wenigen Jahren angegeben (Mollenhauer und Kuettner 1997, Martinek 2003).

GAGs sind unverzweigte Polysaccharidketten, die sich aus Disaccharideinheiten (meist Aminosucker und Zuckersäuren) zusammensetzen. Man unterscheidet aufgrund der Bindung zwischen den Zuckern, sowie der Zahl und Lage der Sulfatgruppen vier GAG-Klassen:

(1) Hyaluronan (HA), (2) Chondroitinsulfat und Dermatansulfat, (3) Heparansulfat und (4) Keratansulfat.

Das einfachste GAG ist Hyaluronan (auch Hyaluronsäure). Es besteht aus bis zu 25.000 immer identischen Disaccharideinheiten (Glukose-Glukuronsäure) (Alberts et al. 2004). Neben seiner wichtigen Funktion beim Aufbau der EZM (siehe unten) ist HA auch ein wichtiger Bestandteil der Synovia (Gelenkflüssigkeit): Ohne den Einfluss mechanischer Belastung ist Hyaluronan ein globulär vorliegendes Polymer. Unter plötzlichem Druck trägt es zur hohen Viskosität der Synovia im Gelenkspalt bei. Bei Auftreten von Scherkräften dagegen, formen sich lineare Filamente, die den Gelenkflächen longitudinal ein sanftes Gleiten aufeinander ermöglichen.

Mit Ausnahme der Hyaluronsäure, liegen alle GAGs in kovalenter Bindung mit Proteinen in Form von Proteoglykanen vor (s. Abb. 3). An das so genannte Core-Protein werden dabei über spezielle Bindeglied-Tetrasaccharide flaschenbürstenartig bis zu einige hundert verschiedene Glykosaminoglykanketten geknüpft (Hardingham und Fosang 1992).

Das größte und häufigste Proteoglykan des Knorpels ist das Aggrekan. An seinem Kern-Protein unterscheidet man drei globuläre (G_1 , G_2 , G_3) und zwei interglobuläre Domänen (E_1 und E_2). Während vorwiegend in der Region E_2 die Glykosaminoglykane binden, kann das Aggrekan mit der N-terminalen G_1 -Domäne, wie andere Proteoglykane auch, über ein Konnektionsprotein (Hyaluronectin) an eine Hyaluronsäurekette binden (Sandy und Plaas 1989). Auf diese Weise können riesige, für die Namensgebung entscheidende, Aggregate von mehreren Megadalton Molekulargewicht entstehen (Doege et al. 1991).

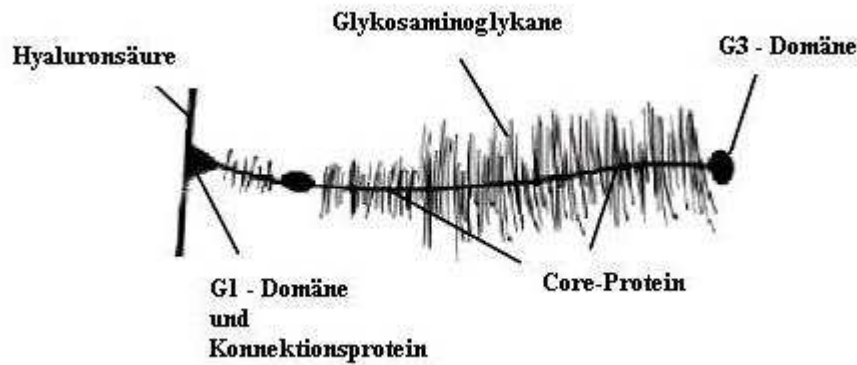


Abb. 3: Struktur eines Proteoglykans (modifiziert nach Martinek, 2003)

Mit ihrer hohen Dichte negativer Ladungen, die auf die zahlreichen Carboxyl- und Sulfatgruppen zurückzuführen sind, ziehen sie osmotisch aktive Kationen, meist Na^+ , und große Wassermengen an, welche so in der Matrix „gebunden“ werden. 50 mg Proteoglykane entsprechen dabei etwa 400mg im Knorpel gespeicherten Wassers (Maroudas 1986). Die in freier Lösung auf ein Vielfaches ihres Volumens anschwellenden Proteoglykane sind allerdings innerhalb des Kollagennetzwerkes in ihrem Hydratisierungsvermögen auf etwa 20 % ihres Potentials beschränkt (Poole 1993). Deshalb besteht ein ständiges Bestreben mehr Wasser aufzunehmen. Im Wechselspiel mit den zugfesten Kollagenen wird so im Gewebe ein hoher hydrostatischer Druck aufgebaut, welcher dem Knorpel die ihn auszeichnende prall-elastische Druckfestigkeit verleiht und durch Volumenausgleich bei Belastung die visko-elastische Verformung des Gewebes ermöglicht (Mollenhauer und Aurich 2003).

Glykoproteine (GPs)

Innerhalb der EZM stellt diese Gruppe zwar eine mengenmäßig geringere, aber für die funktionellen Eigenschaften nicht minder wichtige Komponente des Knorpels dar. Eine Vielzahl von Glykoproteinen ist bisher beschrieben worden, deren Verteilung und Aufgaben bei weitem noch nicht erschöpfend aufgeklärt sind. Daher erfolgt hier nur eine kurze Darstellung einiger bisher als maßgeblich für die Knorpelfunktion erkannter Familienmitglieder.

Wie die Proteoglykane binden auch GPs das interstitielle Wasser und helfen in ihrer Funktion als Adhäsionsmoleküle das makromolekulare Netzwerk zu organisieren und stabilisieren. So legen Glykoproteine wie COMP (cartilage oligomeric protein) oder Tenascin aufgrund ihrer dreidimensionalen, spinnenartigen Struktur die Vermutung nahe, an der Vernetzung der EZM beteiligt zu sein (Morgelin et al. 1992, Rosenberg et al. 1998). Zelloberflächen-assoziierte GPs wie Chondronectin, CMGP (cartilage matrix glycoprotein) und Anchorin scheinen, wie

auch Fibronectin wichtige Funktionen bei der Verankerung der Chondrozyten in der EZM, der Organisation eines stabilen Kollagennetzwerkes und bei Zell-Matrix-Interaktionen zu übernehmen (Clemmensen et al. 1982, Mollenhauer und Kuettner 1997). Weitere Aufgaben übernehmen die Glykoproteine z.B. an der Gelenkfläche: Lubricin als Schmiermittel, das Thrombospondin-1 bei der Speicherung und Aktivierung von Wachstumsfaktoren und als potentes Angiostatikum (Miller und McDevitt 1988, Crawford et al. 1998, Pfander et al. 2000) oder wie im Falle des Chondrocalcin als eigenständiges Strukturelement der Knorpelmatrix. Chondrocalcin ist ein ausschließlich in Knorpel zu findendes Kalzium-bindendes GP, das ursprünglich das N-terminale Propeptid des Typ-II-Kollagens darstellt und bei der Reifung der Kollagenfibrille abgespalten wird (Van der Rest et al. 1986).

5.2.3 Struktureller Aufbau des Gelenkknorpels

Die einzelnen Knorpelkomponenten bilden ein hoch komplex organisiertes Gewebe, welches sich in Abhängigkeit von der Gelenkflächen-Entfernung kontinuierlich verändert. Dabei kann eine grobe Einteilung in vier horizontale Schichten, mit charakteristischen Unterschieden in Zellmorphologie, Fibrillenverlauf und Matrixzusammensetzung erfolgen (s. Abb. 4):

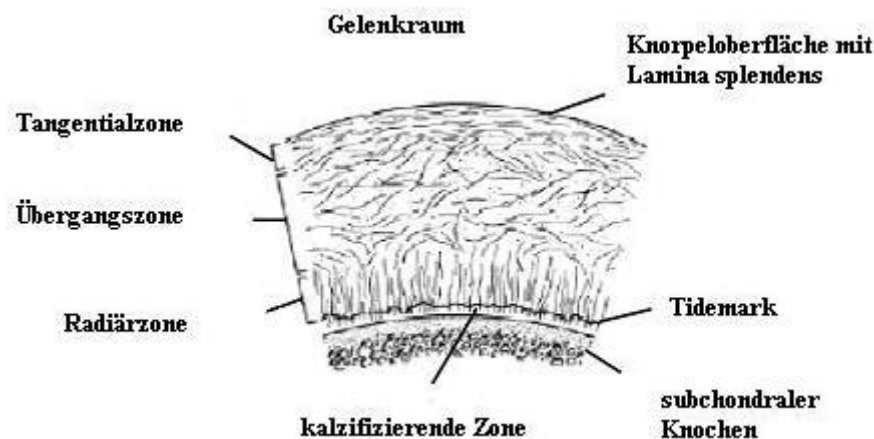


Abb. 4: Zonale Gliederung hyalinen Knorpels mit schematischer Darstellung des Kollagenfaserverlaufs (Vertikalschnitt, modif. nach Martinek, 2003)

(1) Oberflächliche Zone (Tangentialzone, Zone I)

Die etwa 10-15 % der Gesamtdicke des Knorpels einnehmende Tangentialzone zeichnet sich durch spindelförmige, in ein bis drei Schichten parallel zur Gelenkfläche liegenden Chondrozyten aus. Diese machen in ihrer Gesamtheit nicht mehr als 10 % aller Knorpelzellen aus und weisen nicht nur morphologisch sondern auch metabolisch wesentliche Unterschiede zu den tiefer liegenden Knorpelzellen auf. So produzieren die superfiziellen Zellen nicht nur eine

spezifische EZM mit hohem Kollagen- und Fibronectinanteil (Buckwalter und Mankin 1997a), sondern besitzen noch einige weitere distinkte Eigenschaften. Die Zone I übernimmt neben den mechanischen Aufgaben (Roth und Mow 1980) nämlich auch die Funktion einer Art Basalmembran, also die Abgrenzung des Knorpels von umgebenden Geweben und Flüssigkeiten sowie den darin enthaltenen Zellen. Neben einer hohen Sensitivität für Interleukin-1 erinnern die oberflächlichen Chondrozyten auch mit ihrer Fähigkeit zur Phagozytose und der Abgabe reaktiver Sauerstoffspezies an die Funktion von Makrophagen (Mollenhauer und Kuettner 1997). Die oberflächliche Zone ist entsprechend der hier vorwiegend auftretenden Scher- und Dehnungskräfte geprägt durch einen hohen Anteil tangential verlaufender Kollagenfasern, welche die Belastung gleichmäßig über die gesamte Knorpeloberfläche verteilen (Bullough und Goodfellow 1968). Der Proteoglykangehalt dieser Schicht ist gering und der Wasseranteil in dieser Schicht mit nahezu 80 % des Nassgewichtes am höchsten. Ein dünner Belag feiner Fibrillen ohne zwischengelagerte Zellen, die Lamina splendens, bildet im gesunden Knorpel den Abschluss zum Gelenkspalt (Buckwalter und Mankin 1997a).

(2) Mittlere Zone (Übergangszone, Zone II)

Kennzeichen der Übergangszone ist die sich in diesem Bereich des Knorpels ändernde Verlaufsrichtung der Fasern. Die Zellen der mittleren Zone sind von eher sphärischer Form und einzeln oder in kleinen Gruppen angeordnet. Sie sind umgeben von einem Hof „perizellulärer“ und anschließend der „territorialen“ Matrix, welche sich in Eigenschaften und Zusammensetzung von der „interterritoriellen“ Matrix unterscheiden (Mollenhauer und Kuettner 1997, Heinegard et al. 2001). Sowohl mit zunehmendem Abstand von den Zellen als auch mit wachsender Entfernung zur Gelenkfläche nimmt der Durchmesser der Kollagenfibrillen kontinuierlich zu (Hedlund et al. 1993). Der Umsatz der Matrix ist in unmittelbarer Nähe der Chondrozyten weit intensiver als in entfernten Bereichen und die Synthese von Proteoglykanen wesentlich höher im Vergleich zur Tangentialzone.

(3) Tiefe Zone (Radiärzone, Zone III)

Die Zellen der Radiärzone sind hauptsächlich runder bzw. ellipsoider Form und senkrecht zur Knorpeloberfläche in Säulen von 2-6 Zellen angeordnet. Die Chondrozyten in den Zonen II und III produzieren nahezu alle extrazellulären Bestandteile, die im Gelenkknorpel gefunden werden: Kollagene, Proteoglykane, Glykoproteine, Hyaluronsäure sowie die für den Abbau und Umsatz des Gewebes nötigen Enzyme (meist Metalloproteinasen). Ein stark ausgebildeter

Golgi-Apparat, viele Mitochondrien und raues endoplasmatisches Retikulum sind Ausdruck der hohen Matrixsyntheseleistung. Neben dem größten Anteil an Proteoglykanen findet man in der tiefen Zone auch die stärksten Kollagenfaserdurchmesser (Buckwalter und Mankin 1997a). Die Fasern verlaufen hier senkrecht zur Gelenkfläche und tauchen in der Tiefe in die Grenze zwischen nicht-kalzifizierter und kalzifizierter Knorpelmatrix – die so genannte „Tidemark“ – ein. Die Funktion dieser etwa 10µm dicken, zellfreien Schicht ist genau wie ihre Zusammensetzung nur ansatzweise geklärt. Eine Funktion im Rahmen von Mineralisationsprozessen aber scheint sicher (Havelka et al. 1984, Lyons et al. 2005). Die mit zunehmendem Alter in Richtung Gelenkfläche wandernde Tidemark markiert möglicherweise den Bereich jüngster Matrixumsätze der kalzifizierten Schicht oder stellt eine Art Halde für Stoffwechselendprodukte dar.

(4) kalzifizierte Zone (Mineralisierungszone, Zone IV)

Diese Zone stellt die Verbindung zwischen Knorpel und subchondralem Knochen dar. Der Übergang sorgt durch seine zapfenartige Gestaltung für eine feste Verzahnung der unterschiedlichen Gewebe (Martinek 2003, Mollenhauer et al. 2008). Die Chondrozyten in dieser Schicht sind kleiner, rund und weisen eine verhältnismäßig geringe Stoffwechselaktivität auf (Buckwalter und Mankin 1997a).

Jede der einzelnen Zonen trägt einen Teil zur Gesamtfunktion des Gelenkkorpels bei und ermöglicht so auf einzigartige Weise die Verteilung und Kompensation der auf ihn wirkenden, teils ein Mehrfaches des Körpergewichtes messenden Kräfte.

5.2.4 Besonderheiten des Knorpelstoffwechsels

Die bereits zuvor erwähnte Avaskularität adulten hyalinen Gelenkknorpels hat neben Besonderheiten bei der Regeneration des Gewebes auch eine besondere Stoffwechsellaage zur Folge. Ein Substratzustrom kann nur von Gefäßen der Gelenkinnenhaut (*synoviale Drift*) oder dem Markraum des Knochens (*subchondrale Drift*) erfolgen. Letzterer spielt wohl aber außer beim wachsenden Kind oder im Falle einer Verletzung der subchondralen Knochenplatte nur eine untergeordnete Rolle. Die Synovia, ein nährstoffreiches Ultrafiltrat des Blutplasmas, wird im Bereich der Membrana synovialis, der inneren Schicht der Gelenkkapsel produziert (Kölbel 1974). Die dort ansässigen Synoviozyten synthetisieren zusätzlich die in hohen Konzentrationen in der Synovialflüssigkeit vorkommende Hyaluronsäure (s. Kapitel 5.4.3.), Lubricin sowie eine große Spanne regulatorisch wirksamer Komponenten (z.B. Wachstumsfaktoren

und Zytokine) (Sledge et al. 2001). Nährstoffe und Stoffwechselendprodukte werden im Knorpel entweder durch Diffusion oder durch die einem Pumpmechanismus ähnelnden Flüssigkeitsverschiebungen während der Knorpelbelastung ausgetauscht (Radin und Simon 2001).

Bezüglich ihres Energiestoffwechsels weisen die Knorpelzellen eine ganz besondere Eigenschaft auf (s. Kapitel 5.4.4.). So drosselt in einem als „Crabtree effect“ benannten Phänomen der Glukose-Spiegel den Sauerstoffverbrauch in der gut versorgten oberen Schicht des Gelenkknorpels. In der tiefen Zone wird so die aerobe Metabolisierung von Glukose und somit eine deutlich höhere Energieausbeute pro Glukosemolekül ermöglicht (Otte 1991).

5.2.5 Der arthrotisch veränderte Gelenkknorpel

Der genaue Mechanismus des Knorpeluntergangs im Rahmen der Arthrose ist äußerst komplex und bei weitem noch nicht vollständig aufgeklärt. Es lässt sich jedoch grob eine Entwicklung in drei Stadien beschreiben.

Initial ist die Matrixdegeneration zumeist auf die Molekularebene beschränkt. Insbesondere die Schädigung der Querverbindungen des kollagenen Netzwerkes und der nachfolgende Verlust von Proteoglykanen, speziell des Aggrekans, führen zu einer vermehrten Wassereinlagerung und einer damit verbundenen Knorpelerweichung. Infolge dessen verliert der Gelenkknorpel in den betroffenen Bereichen seine prallelastische Druckfestigkeit und wird somit noch anfälliger für pathogene Einflüsse. Diese Schädigung kann durch akute bzw. repetitive mechanische Traumen oder durch entzündliche Prozesse (etwa ausgehend von der Synovia) ausgelöst werden (Buckwalter und Mankin 1997b, Martinek 2003, Pfander 2005).

Stadium zwei lässt sich als Versuch einer Schadenskompensation der für die Homöostase der EZM verantwortlichen Chondrozyten verstehen. Er ist charakterisiert durch eine reaktive Proliferation der Zellen und eine vielfache Steigerung der metabolischen Aktivität insbesondere durch eine vermehrte mRNA-Expression und Synthese der Hauptstrukturkomponenten wie Kollagen Typ II und Aggrecan (Matyas et al. 1995, Aigner et al. 1997). Im weiteren Verlauf treten auch vermehrt extrazelluläre Matrixproteine in Erscheinung, welche im gesunden Gelenkknorpel nur von untergeordneter Bedeutung sind. Dazu gehören unter anderem die Kollagene vom Typ I und III sowie das Kollagen vom Typ X (von der Mark et al. 1992, Aigner et al. 1993). Die vermehrte Synthese von Typ-I- und Typ-III-Kollagen wird dabei mit einer zu beobachtenden phänotypischen Veränderung der Chondrozyten im Sinne einer Dedifferenzierung in Verbindung gebracht. Sie ist insbesondere auch bei Monolayerkulturen isolierter Knorpelzellen zu beobachten (s. Kapitel 5.3.). Demgegenüber gilt die ver-

mehrte Synthese von Kollagen X und der AP als Hinweis auf die Entwicklung in einen hypertrophen Phänotyp, wie er speziell auch bei der Differenzierung von Chondrozyten im Bereich der Wachstumsfugen beschrieben wurde (Cancedda et al. 1985, Kielty et al. 1985, Castagnola et al. 1988). Sowohl die zunehmende Mineralisierung der arthrotischen Knorpelmatrix als auch die zu beobachtenden apoptotischen Vorgänge stützen die These einer terminalen Differenzierung.

Neben der gesteigerten Produktion von Matrixkomponenten findet jedoch ebenfalls eine verstärkte Freisetzung katabol wirkender Mediatoren im Gelenk statt. Durch die Anwesenheit von Fibronectin- und Kollagenfragmenten stimuliert geben sowohl die Chondrozyten selbst, als auch das umgebende Synovialgewebe z.B. Interleukin-1 (IL-1) oder den Tumornekrosefaktor- α ab (Homandberg und Hui 1996, Fichter et al. 2006). Diese katabolen Zytokine inhibieren die Synthese von Proteoglykanen und Kollagenen (Tetlow et al. 2001, Goldring und Goldring 2004) und lösen ferner die Freisetzung von Matrixmetalloproteinasen aus. Beispielhaft sei hier die MMP-3 erwähnt, welche insbesondere im arthrotisch veränderten Knorpel neben der MMP-1 beim Abbau einer Vielzahl von EZM-Bestandteilen eine entscheidende Rolle spielt (Woessner 1991, Wilhelm et al. 1993, Freemont et al. 1997).

Im weiteren Verlauf der Arthrose ist schließlich der biosynthetische Apparat der Chondrozyten nicht mehr in der Lage, die anabolen Anforderungen zu erfüllen und es kommt zu einem Nettoverlust der extrazellulären Matrix. Die Verminderung der anabolen Aktivität liegt einerseits im fortschreitenden Verlust an EZM und dem damit verbundenen Untergang der Chondrozyten, welche nicht mehr durch eine funktionierende Matrix geschützt werden. Andererseits spielt aber auch die verminderte Reaktionsfähigkeit der Knorpelzellen auf anabol wirkende Faktoren (z.B. IGF, TGF- β) eine wesentliche Rolle. Diese könnte unter anderem durch eine vermehrte Synthese und Anreicherung von Matrixmolekülen wie Decorin oder des „insulin-like growth factor binding protein“ (IGFBP) bedingt sein, welche die anabol wirkenden Mediatoren binden und diese somit für die Knorpelzellen unzugänglich machen (Buckwalter und Mankin 1997b, Purple et al. 2002).

Schließlich kommt es zu einem kompletten Verlust der Knorpelschicht und infolge der veränderten Belastung auch zu Begleitreaktionen im Bereich des subchondralen Knochens. Beginnend mit Sklerosierungen, der Bildung subchondraler Knochenzysten ist insbesondere der Anbau so genannter Osteophyten ein wichtiges Element in der radiologischen Diagnostik der Osteoarthrose.

Im Endstadium führen der Verlust des Knorpels und die Umbauvorgänge am Knochen zu einer Deformierung des Gelenkes und können Verkürzungen der betroffenen Extremitäten sowie entsprechende Instabilitäten zur Folge haben.

5.3 Rolle des Tissue Engineering / ACT

Die autologe Chondrozytentransplantation (ACT) wurde erstmals 1987 von Grande et al. tierexperimentell beschrieben (Grande et al. 1987) und bereits im selben Jahr beginnend durch die schwedische Forschungsgruppe um Brittberg und Peterson zum Einsatz beim Menschen gebracht (Brittberg et al. 1994). Sie hat sich in den letzten Jahren zu einer viel versprechenden Methode der biologischen Knorpelregeneration entwickelt. Es handelt sich dabei um ein technisch anspruchsvolles Verfahren mit einem im Vergleich zum Potential noch relativ engen Indikationsspektrum. Die Handhabung der ACT ist derzeit noch mit einigen zellbiologischen und operationstechnischen Problemen behaftet (Aicher und Gaissmaier 2003), die im Folgenden näher erläutert werden sollen.

Für die klassische ACT (nach Brittberg et al.) werden bisher in einem ersten, meist arthroskopischen Eingriff kleinste Mengen gesunden Spenderknorpels (je nach Größe des zu verschließenden Defekts zwischen 150 und 300 mg) aus dem betroffenen Gelenk geerntet, die Zellen mittels eines enzymatischen Verdaus (s. auch Kapitel 6.2.2.) isoliert und in der Regel im Anschluss an eine in-vitro-Expansionsphase in den Defekt übertragen. Dabei werden die aus dem Spendermaterial gewonnenen Chondrozyten (1×10^6 pro cm^2 Defektfläche) als Suspension unter einen auf dem Knorpeldefekt fixierten Periostlappen gespritzt und der darunter liegende Hohlraum so gefüllt (s. Abb. 6). Ziel ist die Generierung eines hyalinen, belastbaren Ersatzgewebes mit guter Integration zum umgebenden Knorpel. Voraussetzung sind dafür derzeit unter anderem ein tragfähiger Umgebungsknorpel mit einer ausreichend vorhandenen „Knorpelschulter“ (Defektrand, s. auch Abb. 5) zur Fixierung des Knochenhautlappens und eine intakte korrespondierende Gelenkfläche. So wird die ACT derzeit primär insbesondere zur Behandlung größerer ($4 - 10 \text{ cm}^2$), fokaler, meist im Rahmen eines Traumas oder einer Osteochondrosis dissecans entstandener Gewebsdefekte Grad III oder IV nach der ICRS-Klassifikation (International Cartilage Repair Society) empfohlen. Hier ist sie den alternativen Methoden wie der Mikrofrakturierung oder der Mosaikplastik aufgrund der besseren Ergebnisse vorzuziehen. Bei kleineren Defekten ($< 4 \text{ cm}^2$), zeigt die ACT bei Versagen der anderen Methoden als Second-line-treatment ebenfalls noch gute bis sehr gute Ergebnisse (Behrens et al. 2004).

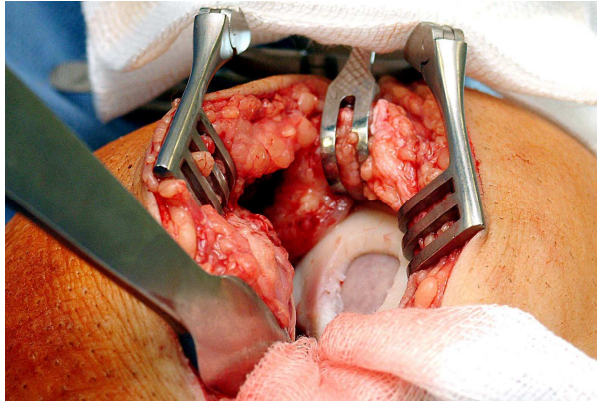


Abb. 5: OP-Situs im Rahmen einer klassischen ACT; dargestellt ist der bereits präparierte fokale Knorpeldefekt mit deutlich vorhandener Knorpelschulter auf welcher im Anschluss der Periostlappen mittels Nähten und Fibrinkleber fixiert wird

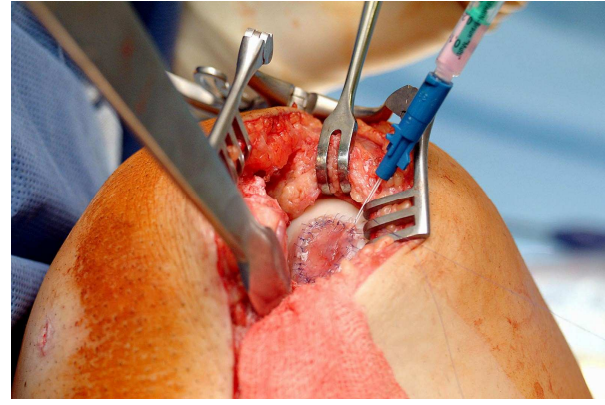


Abb. 6: Applikation der Chondrozytensuspension in den unter dem Periostlappen liegenden Hohlraum; anschließend Verschluss der Injektionsstelle mit Fibrinkleber

(Bilder mit freundl. Genehmigung von H. Hauk, Waldkrankenhaus „Rudolf Elle“ gGmbH Eisenberg mit Lehrstuhl für Orthopädie der Friedrich-Schiller Universität Jena)

Wie bereits erwähnt, weist die herkömmliche Form der ACT jedoch auch einige Nachteile auf, welche die Gefahr postoperativer Komplikationen in sich bergen. So sammeln sich die in Suspension gehaltenen Knorpelzellen rasch im Bereich der Knorpelwände und des Defektbodens und es entsteht eine hyperzelluläre Grenzschicht (Sohn et al. 2002). Eine gleichmäßige Verteilung der Zellen ist also nicht gegeben und ein Einfluss auf die Matrixsynthese nicht auszuschließen. Des Weiteren kann es bei frühzeitigem Abscheren des Knochenhautlappens zum Verlust der in die Defektkammer injizierten Chondrozyten kommen (Aicher und Gaissmaier 2003, Fritz et al. 2005) und vereinzelt wurden revisionsbedürftige, vom Periostlappen ausgehende Transplantathypertrophien beobachtet.

Ein erheblicher Nachteil des klassischen Verfahrens liegt allerdings in der, je nach Lage des Defektes, für die Operation notwendigen, mehr oder minder weiten Eröffnung des Gelenkes (Arthrotomie) und einer damit einhergehenden Zerstörung des Kapsel-Band-Apparates.

Die Entwicklung der ACT geht daher in Richtung einer biologischen Knorpelrekonstruktion durch eine Träger-gestützte ACT mit dem Ziel, diese arthroskopisch / minimalinvasiv durchführen zu können. Das heißt, die Chondrozyten könnten anstatt wie bisher als Suspension appliziert, nun eingebunden in eine formstabile Trägermatrix und dem entsprechenden Defekt angepasst implantiert werden. Eine vollständige Eröffnung des Gelenkes ist nicht mehr nötig. Derzeit werden hier mehrere Ansätze verfolgt. Neben einigen bereits in der klinischen Anwendung befindlichen Kollagen-basierten Trägern, der experimentellen Testung synthetischer

Polymer-Matrices und von Peptid-Hydrogelen, wird auch die Entwicklung von biphasischen Knorpel-Knochenimplantaten vorangetrieben (Aicher und Gaissmaier 2003).

Die Einsatzfähigkeit solcher Trägermaterialien vorausgesetzt, ergibt sich daraus auch eine mögliche Erweiterung des Indikationsspektrums. So bietet die Träger-gestützte ACT mittels biomechanisch stabiler Chondrozyten-Matrix-Implantate zusätzliches Potential zur Behandlung größerer und weniger deutlich vom Umgebungsgewebe abgegrenzter Defekte, wie sie insbesondere auch bei den degenerativen Gelenkerkrankungen auftreten.

Neben den operativ-praktischen Bedenken stehen einer solchen Indikationserweiterung, auf beispielsweise osteoarthrotisch bedingte Knorpelveränderungen, allerdings noch weitere nicht zu vernachlässigende zell- und molekularbiologische Aspekte gegenüber.

So sind z.B. bei großflächigen Defekten meist auch die restlichen Gelenkflächen vom Krankheitsprozess mit betroffen und die zu erntenden Knorpelzellen weisen häufig bereits ein vom Gesunden abweichendes Genexpressions- und Stoffwechselprofil auf (Aigner und Dudhia 1997, Fan et al. 2005). Ebenso darf nicht übersehen werden, dass mit zunehmendem Patientenalter die Mitose- und Syntheseaktivität von Chondrozyten (Martin und Buckwalter 2003) und somit wohl auch die Fähigkeit zur Regeneration hyalinen Knorpelgewebes immer weiter abnimmt.

Weiterhin lassen sich die zur entsprechenden Deckung großer Knorpelschäden nötigen Zellmengen aus den derzeit üblichen Biopsien nicht gewinnen, ohne dabei in einer relativ langen Expansionsphase eine vollständige Dedifferenzierung der Chondrozyten in Kauf zu nehmen. Dabei kommt es im Rahmen der Kultivierung zu einer Veränderung des Aussehens der Zellen von einer differenzierten, runden/polygonalen Form hin zu einem spindelförmigen, fibroblasten-ähnlichen Phänotyp. Dieser äußerliche Wandel wird zusätzlich von Veränderungen auf der Ebene von Genexpression und Proteinsynthese begleitet, welche zum Teil stark vom Profil einer normalen Gelenkknorpelzelle abweichen. So sinkt die knorpelspezifische Expression von Kollagen Typ II ab, während die Synthese des für Knochen und Bänder typischen Kollagen Typ I im Kulturverlauf zunimmt (Duchene et al. 1982, Benz et al. 2002, Schnabel et al. 2002).

Entsprechend bestehen Bestrebungen, diese Entwicklung in vitro z.B. über die Zusammensetzung des Kulturmediums zu verhindern und die Zellen somit in positiver Weise zu beeinflussen (Malpeli et al. 2004, Gaissmaier et al. 2005). Da aber offenbar Differenzierungsstatus

und Zellzyklus von Chondrozyten in unmittelbarem Zusammenhang zueinander stehen, erscheint eine Dedifferenzierung der Zellen für die Expansion unumgänglich (Beier et al. 1999). Entscheidend ist ohnehin die Fähigkeit zur erneuten (Re-)Differenzierung mit Synthese der entsprechenden knorpeltypischen Matrixbestandteile (z.B. in dreidimensionaler Kultur oder einem entsprechendem Trägermaterial) (Benya und Shaffer 1982, Castagnola et al. 1988, Grigolo et al. 2005).

Die existierenden Techniken zur Gewinnung transplantationsfähiger Zellen sind bisher nur an gesunden Knorpelzellen etabliert worden. Für einen zukünftigen Einsatz der ACT auch bei manifesten Arthrosen ist somit die wissenschaftliche Untersuchung der Übertragbarkeit dieser Verfahren auf die Zellgewinnung aus degenerativ verändertem Knorpel ein wichtiger Schritt.

Zu den allgemeinen Verfahren und dem Einfluss unterschiedlicher Kultivationsverfahren (z.B. Monolayer-, Agarose- oder Alginatkultur) auf humane Chondrozyten ist bereits eine Vielzahl von Arbeiten veröffentlicht. Vor- und Nachteile der jeweiligen Systeme wurden von Huch et al. 2002 in einem vergleichenden „[...] Überblick über Verfahren zur Kultivierung artikulärer Chondrozyten“ zusammengetragen (Huch et al. 2002). In Anpassung an die jeweilige Fragestellung lassen sich diese Systeme auch auf Zellen aus bereits osteoarthrotisch verändertem Gewebe übertragen und werden vielfach in der Forschung genutzt.

Auch die Einflussnahme auf Genexpression und Syntheseleistung arthrotisch veränderter Chondrozyten während der Expansionsphase ist in der Literatur mit einer Vielzahl von Ansätzen dokumentiert und der Entwicklung optimierter Kulturbedingungen kommt sicherlich eine entscheidende Bedeutung bei der Gewinnung transplantationsfähiger Zellen zu (Malpeli et al. 2004, Carossino et al., Giannoni et al. 2005).

Jedoch blieb eine aus meiner Sicht durchaus kritische Phase bisher weitestgehend unbeachtet, nämlich die der unmittelbaren Isolation der Zellen aus dem Gewebeverband.

5.4 Die Phase der Zellisolation

In erster Linie waren hier bisher Kriterien wie die gewonnene Zellzahl pro Gewicht des verdauten Knorpelgewebes und die Vitalität der gewonnenen Zellen Gegenstand der experimentellen Untersuchung. Dabei lag das Hauptaugenmerk auf den für die Isolation eingesetzten Enzymen beziehungsweise der Verdautemperatur (Jakob et al. 2003, Hidvegi et al. 2006). Andere Parameter, wie etwa die Zusammensetzung des Verdaumediums, analog der Überle-

gungen, wie sie für die Expansionsphase (s.o.) beschrieben sind, blieben in diesem Zusammenhang in der Literatur bisher unbeachtet.

Die Zellen sind während des Übernachtverdaus durch den Verlust ihrer natürlichen Umgebung (der EZM) einer hohen Belastung ausgesetzt und unterliegen dabei dem Einfluss einer Vielzahl von Faktoren. So entstehen durch den enzymatischen Verdau große Mengen von Matrixfragmenten, die direkt bzw. indirekt in der Lage sind, Zellfunktionen zu beeinflussen. Bruchstücke des Glykoproteins Fibronectin beispielsweise zeigen in hohen Konzentrationen unter Zellkulturbedingungen einen deutlichen Einfluss auf die Freisetzung von katabol wirkenden Metalloproteinasen sowie einen suppressiven Effekt auf die Synthese von Proteoglykanen (Homandberg und Hui 1996, Purple et al. 2002). In ähnlicher Weise unterdrücken Kollagen-Typ-II-Fragmente die Kollagenbiosynthese und sind ebenfalls an Induktion und Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen (MMP-2, -3, -9 und -13) beteiligt (Jennings et al. 2001, Fichter et al. 2006).

Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage nach dem Einfluss der an Matrixfragmenten reichen Verdauphase auf den Metabolismus der Knorpelzelle, ihrer Bedeutung für eine nachfolgende Expansion sowie nach den Möglichkeiten einer Lenkung der hier stattfindenden Vorgänge.

Zellkulturmedien wie Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Ham's F-12 oder eine Kombination der beiden (DMEM/F-12), welche standardmäßig in der Gewinnung und Kultivierung von Chondrozyten verwendet werden, bieten neben der Untersuchung schon enthaltener Komponenten auch die Möglichkeit weiterer Zusätze. Insbesondere in der Kulturphase wird dies durch die Zugabe von Hormonen, Wachstumsfaktoren oder Vitaminen häufig realisiert.

Auf drei wesentliche, häufig in Isolations- u. Kulturmedien enthaltene Bestandteile bzw. Zusätze soll im Folgenden kurz eingegangen werden und im Anschluss ein weiterer Ansatz (Minimalmedium) näher erläutert werden:

5.4.1 Calcium (Ca^{2+})

Calcium ist einerseits ein gut bekannter intrazellulärer Botenstoff, der eine Fülle vitaler Zellprozesse steuert, andererseits aber auch ein essentieller Bestandteil extrazellulärer Strukturen und Kofaktor von Schlüsselprozessen, wie z.B. der Blutgerinnung (Brown et al. 1995, Berridge et al. 1999). Die Anwesenheit von Ca^{2+} in der extrazellulären Flüssigkeit spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Knorpel- und Knochenbildung sowie deren Stoffwechsel (Bingham und Raisz 1974, Deshmukh et al. 1976, Bergstrom 1998).

Die Anwesenheit Ca^{2+} -messender Rezeptoren - ähnlich den in Nebenschilddrüsen und Nieren vorkommenden - ist bereits für hypertrophe Chondrozyten der Wachstumsfuge sowie einige chondrogene Zelllinien (RCJ3.1C5.18 und CFK2) beschrieben worden (Chang et al. 1999a, Chang et al. 1999b, Wang et al. 2001). Am Beispiel der vom fetalen Rattenschädel abstammenden C5.18 Zelllinie wurde über eine Dosisabhängigkeit der mRNA-Niveaus für Aggrekan, Kollagen Typ II und X sowie der AP berichtet, wobei mit steigender Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]$: 0,4 mM bis > 6,0 mM) des Kulturmediums eine Abnahme der Genexpression auftrat.

Parallel dazu wurde für die ebenfalls von der Ratte abstammenden chondrogenen CFK2 Zellen eine dosisabhängige ($[\text{Ca}^{2+}]$: 0,4 mM bis 4,8 mM) Zunahme der Kollagen-Typ-X-Expression beschrieben. Diese Beobachtung deckt sich mit Ergebnissen, die Bonen und Schmid anhand in Kultur gehaltener Chondrocyten von Hühnerembryonen gewinnen konnten ($[\text{Ca}^{2+}]$: 1,8 mM bis 11,8 mM) (Bonen und Schmid 1991, Koyano et al. 1996).

Untersuchungen mit Kaninchenknorpelzellen beschrieben ein Ca^{2+} -abhängiges Umschalten der Synthese von knorpelspezifischem Typ-II-Kollagen hin zu einer Produktion von Kollagen Typ I ($[\text{Ca}^{2+}]$: 10 μM bis 1 mM) (Deshmukh et al. 1976). Gigout et al. konnten ähnliches für Monolayer- bzw. Suspensionskulturen boviner Chondrozyten mit Ca^{2+} -Konzentrationen des Kulturmediums im Bereich von 15 μM bis 1 mM Ca^{2+} berichten (Gigout et al. 2005). Diese Zunahme der relativen Kollagen-Typ-I-Synthese konnte auch in hauseigenen Untersuchungen an bovinen Gelenkknorpelkulturen bei erhöhtem Extrazellulär- Ca^{2+} beobachtet werden ($[\text{Ca}^{2+}]$: 0,4 mM vs. 5,0 mM). (Stonans, Mollenhauer, 2005)

Wenngleich die erfassten Effekte extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen anhand verschiedener Modellsysteme untersucht wurden, deuten doch alle übereinstimmend auf einen Einfluss des extrazellulär vorhandenen Calciums hin. Somit stellte sich die Frage nach dem möglichen Effekt des in handelsüblichen Medien vorkommenden Calciums (z.B. 1,05 mM in DMEM/F-12) auf die chondrozytenspezifische Genexpression bzw. Proteinsynthese.

5.4.2 Phenolrot

Phenolrot findet in seiner Funktion als pH-Wert-abhängiger Indikatorfarbstoff im Bereich der Zellkultur eine breite Anwendung und ist in der Regel Bestandteil der im Handel erhältlichen Standardnährmedien (Fa. US-Biological, Fa. Sigma-Aldrich usw.).

Die Ähnlichkeiten seiner Struktur im Vergleich mit einigen nichtsteroidalen Östrogenen gaben Mitte der 80er Jahre Anlass zu der Überlegung, ob Phenolrot als Ligand an Östrogenrezeptoren fungieren kann (siehe dazu auch Abb. 7).

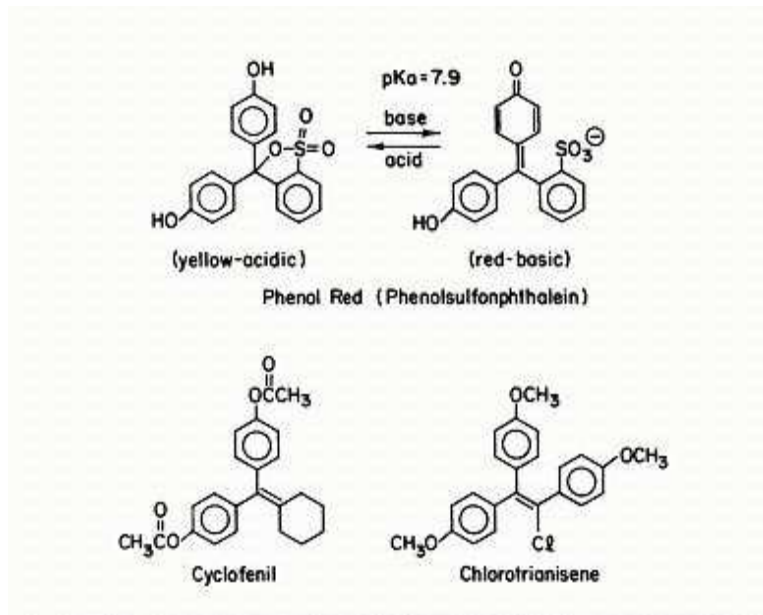


Abb. 7: Struktur von Phenolrot und einiger strukturell verwandter nichtsteroidaler Östrogene (modifiziert nach Berthois et al., 1986)

Berthois et al. veröffentlichten 1986 eine entsprechende Arbeit, in welcher der Einfluss von in Zellkulturmedien enthaltenen Phenolrotkonzentrationen untersucht und dabei anhand einer östrogenrezeptortragenden Brustkrebszelllinie (MCF-7) eine phenolrotabhängige Zellproliferation und Synthese spezifischer Proteine beobachtet wurde. Durch Zugabe eines Anti-östrogens (Tamoxifen) konnten diese Effekte unterdrückt werden bzw. waren bei gleicher Versuchsanordnung und Verwendung einer östrogenrezeptornegativen Zelllinie (MDA-MB-231) nicht mehr auslösbar. Mit 0,001 % der Affinität von Östradiol am Östrogenrezeptor besitzt Phenolrot zwar eine relativ niedrige Bindungsneigung, ist aber mit 15 bis 45 μM in Standardmedien (z.B. DMEM) in vergleichsweise hohen Konzentrationen vertreten (Berthois et al. 1986, Welshons et al. 1988).

Im Anschluss an den Nachweis von Östrogenrezeptoren und die Dokumentation des Umsatzes von Östrogenen in Gelenkknorpel und frisch isolierten Chondrozyten von Kaninchen (Rosner et al. 1982, Bellino 1992), wurden auch in humanen Knorpelzellen zwei Isoformen eines östrogenabhängigen Rezeptors (Östrogenrezeptor- α und - β) nachgewiesen (Ushiyama et al. 1999, Egerbacher et al. 2002). In-vitro-Versuche zeigten außerdem dosisabhängige Veränderungen im Umsatz von Matrixproteinen (z.B. eine Steigerung der Kollagen-Typ-X-Synthese), den suppressiven Einfluss auf die Proliferationsrate (Talwar et al. 2006) und einen die Differenzierung fördernden Effekt von Östrogenen auf in Kultur gehaltene Knorpelzellen (Nasatzky et al. 1993, Richette et al. 2003).

Anhand eines in-vivo-/in-vitro-Modells, in welchem ovariektomierte Makakenaffen einer Östrogenersatztherapie unterzogen wurden, konnte eine vermehrte Proteoglykansynthese, sowie die vermehrte Produktion von Wachstumshormonrezeptoren für den insulin-like

growth factor 1 (IGF-1) in adulten Gelenkknorpelzellen beobachtet werden (Richmond et al. 2000).

Aufgrund der bestehenden Datenlage ist also für östrogenrezeptortragende Zellen, wie eben humane artikuläre Chondrozyten, von einem Einfluss des Indikatorfarbstoffes Phenolrot auf Genexpression bzw. Stoffwechselleistungen der betroffenen Zellen auszugehen und erfordert auch für die Phase der Isolation eine genauere Untersuchung.

5.4.3 Hyaluronsäure (HA)

Die Hyaluronsäure ist nicht nur, wie bereits erwähnt, ein integraler Bestandteil der Knorpelmatrix und der den Gelenkspalt ausfüllenden Synovia, sondern findet auch in der Therapie der Osteoarthritis im Rahmen der so genannten Viskosupplementation (Injektion von Hyaluronsäurepräparaten in den Gelenkspalt) eine breite Anwendung. Dabei zielt der Einsatz im Rahmen arthrotischer Prozesse in erster Linie auf eine Verbesserung der rheologischen Eigenschaften (Elastizität und Viskosität) der Gelenkflüssigkeit. Hintergrund hierfür ist die oft zu beobachtende verminderte Konzentration und reduzierte Größe der in der Synovia osteoarthrotischer Gelenke befindlichen Hyaluronsäuremoleküle (Dahl et al. 1985).

Es gibt eine kaum überschaubare Menge an klinischen Studien, welche sich mit der intra-artikulären Applikation von HA und den entsprechenden Derivaten beschäftigt und in deren Verlauf ein überwiegend positiver Effekt bezüglich Schmerz und Funktion der betroffenen Gelenke beschrieben wird (Brandt et al. 2000, Lo et al. 2003, Bellamy et al. 2006). Dieser hält zumeist mehrere Wochen bis Monate nach der letztmaligen Injektion an. Da aber ein Großteil der applizierten HA bereits wenige Stunden nach Verabreichung schon nicht mehr im Gelenkspalt nachzuweisen ist, scheinen neben der Verbesserung der synovialen Eigenschaften noch andere Faktoren eine Rolle zu spielen (Ehlers et al. 2001).

Möglicherweise lassen sich einige der beschriebenen Effekte injizierter Hyaluronsäurepräparate auf die Interaktion mit dem Glykoprotein CD44 zurückführen, einem HA-bindenden Oberflächenrezeptor, welcher Zell-Matrix-Kontakte vermittelt (Knudson und Knudson 2004). Bovine Alginatkulturen beispielsweise, zeigten unter dem Einfluss niedriger HA-Konzentrationen (0,1 und 1 mg/ml) eine erhöhte Proliferationsrate, eine vermehrte Glykosaminoglykan- und Kollagen-Typ-II-Synthese, sowie eine Unterdrückung der Kollagen-Typ-I-Produktion im Vergleich mit einer HA-freien Kontrollgruppe (Akmal et al. 2005).

Bei der Kultivation von Explantaten (Knorpelstücken) aus bovinen und humanen Knien erwies sich HA als deutlich protektiver Faktor gegenüber der Penetration von Fibronectinfragmenten (s.o.) in den Knorpel und verzögerte somit deren bereits erwähnten negativen

Einfluss auf die Freisetzung von MMPs und die Proteoglykansynthese (Homandberg et al. 1997, Kang et al. 1999).

An humanen, osteoarthrotisch veränderten Knorpelzellen in Monolayerkultur konnte HA-abhängig eine reduzierte Expression von MMP-1 beobachtet werden, welche nach Blockade von CD44-Rezeptoren mit anti-CD44-Antikörpern nicht mehr nachzuweisen war. Die Expression von RANTES, einem Mediator, der über Induktion von MMP-3 und die Suppression der Proteoglykanproduktion am Knorpelabbau beteiligt ist (Yuan et al. 2001), konnte ebenfalls beeinflusst werden. So wurde durch die Zugabe von HA mit einem Molekulargewicht von 800 bzw. 1.900kD eine Reduktion der mRNA-Synthese des katabol wirkenden Chemokins in IL-1 stimulierten OA-Chondrozyten bewirkt. Die Blockade der CD44-Rezeptoren hatte hierbei aber keinerlei Einfluss, so dass von einem weiteren Wirkmechanismus der HA ausgegangen werden muss (Tanaka et al. 2006).

Ehlers et al. berichteten über erhöhte Proliferationsraten humaner Chondrozyten in Kultur und eine vermehrte Synthese von Kollagen Typ II und Aggrekan nach Stimulierung mit geringen HA-Konzentrationen (Ehlers et al. 2001).

Hyaluronsäurebruchstücke, wie sie auch während der enzymatischen Isolation von Knorpelzellen im Verdaumedium entstehen, haben nachgewiesenermaßen das Potential, die Produktion und Freisetzung von Stickstoffoxid (NO) zu katalysieren. Die Freisetzung größerer NO-Mengen treibt dabei Apoptose und eine gesteigerte katabole Stoffwechsellage an, die sich in einer verminderten Kollagen-II- und Proteoglykansynthese sowie der Induktion von MMPs niederschlägt (Knudson et al. 2000, Knudson und Knudson 2004).

Vor dem Hintergrund dieser Informationen erschien es sinnvoll, während des enzymatischen Verdaus (s. Kapitel 6.2.2.) den Einfluss des Zusatzes von HA und eine damit verbundene mögliche Neutralisation von HA- und Kollagenfragmenten am Chondrozyten genauer zu analysieren. Über eine Verdrängung dieser Matrixabbauprodukte könnten sich die mit ihnen in Verbindung gebrachten negativen Einflüsse auf Genexpression und Metabolismus der Knorpelzellen eventuell beeinflussen lassen.

5.4.4 *Minimalmedium*

Die externe Zufuhr von Glukose ist, wie für andere Zellen auch, essentiell zur Deckung des Energiebedarfs der Chondrozyten. Glukose stellt zusätzlich zur Funktion als Energieträger außerdem ein wichtiges Ausgangsmolekül zur Synthese extrazellulärer Matrixmoleküle wie den Glykosaminoglykanen dar.

Die durchschnittlich in der Synovia enthaltene Glukosekonzentration von 5,0 mM sinkt mit zunehmender Knorpeltiefe auf nahezu Null ab (Otte 1991). Dass die Chondrozyten auch unter diesen Bedingungen ihren Energiebedarf decken und den Syntheseleistungen nachkommen können, hängt mit dem bereits erwähnten Crabtree-Effekt, also der Glukose-induzierten Suppression des oxidativen Energiegewinns, in den oberen Knorpelschichten zusammen.

In Standardmedien werden vergleichsweise hohe Glukosekonzentrationen von 5,6 bzw. 25,2 mM (1,0 bzw. 4,5 g/l) verwendet. Während für die notwendigen Proliferations- und Syntheseleistungen in der Expansionsphase bzw. im Rahmen des Anzüchtens der Zellen in Träger-Matrices sicherlich ein erhöhter Energiebedarf besteht, erschien es hingegen ungünstig, den Chondrozytenstoffwechsel bereits im Lauf der vergleichsweise widrigen Isolationsphase (s.o.) mit einem Substratüberschuss anzukurbeln. Vielmehr erscheint es vorteilhaft die von Natur aus bradytrophen Knorpelzellen während des enzymatischen Verdaus in ihrem trägen Stoffwechselzustand zu halten.

Über eine Reduktion der Substratzufuhr könnte es somit möglich sein, die Zellen in ihrer natürlichen metabolischen Situation zu arretieren, um sie erst später, unter optimierten Bedingungen mit der für Proliferation und Matrixsynthese nötigen Energie in Form von Glukose zu versorgen. Eine Minimalversorgung der isolierten Knorpelzellen sollte über den Zusatz von 0,1 g Glukose/l (0,56 mM) zum Verdaumedium gewährleistet werden.

5.5 Problemstellung und Ziel der Arbeit

Die kurative Behandlung großflächiger ($> 10 \text{ cm}^2$) Gelenkknorpelschäden auf der Basis von degenerativen oder traumatischen Erkrankungen stellt bis heute in der Orthopädie ein ungelöstes Problem dar. Neben dem Gelenkersatz durch Endoprothesen, der allerdings stark invasiv, eigentlich nicht kausal und mit langfristigen Komplikationen belastet ist, gibt es momentan keinen zufrieden stellenden Therapieansatz zur Wiederherstellung der betroffenen Knorpelpartien mit einem funktionellen und biomechanisch vollwertigen Ersatzgewebe.

Kürzliche Fortschritte bei der Entwicklung biomechanisch stabiler, Träger-gestützter ACT-Modelle ermöglichen es, die bisheriger Indikationsstellung für die ACT [Behandlung kleiner ($< 4 \text{ cm}^2$) bzw. mittelgroßer ($4 - 10 \text{ cm}^2$), fokaler Knorpeldefekte Grad III oder IV nach der Klassifikation der International Cartilage Repair Society] auf die Therapie von ausgedehnten Knorpel-(Knochen) Defekten bzw. früharthrotischen Knorpelschäden auszuweiten. Um diese Verfahren auch für die neuen Indikationen zu nutzen, müssen Techniken zur Gewinnung und *in vitro* „Regeneration“ von Chondrozyten aus Defektzonen des betroffenen Gelenkes bzw. aus gesundem Spenderknorpel anderer Gelenke entwickelt und optimiert werden. Während der Isolierung und anschließenden Kultivierung der Chondrozyten kommt es nämlich zu massiven Veränderungen des Expressionsprofils, z.B. einer zunehmenden Dedifferenzierung und Expression knochentypischer Proteine.

Übergeordnetes Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, den chondrozytären Phänotyp bereits in der Isolationsphase zu stabilisieren, um für die nachfolgende Kultivierung die Expression knorpeltypischer Proteine zu begünstigen. Insbesondere sollte der Einfluss folgender Variationen im Verdaumedium analysiert werden:

- Veränderung des Ca^{2+} -Gehaltes
- Zusatz des Indikatorfarbstoffes Phenolrot (potentieller Östrogenrezeptor-Ligand)
- Zusatz von HA
- Veränderung der Glukose- und Nährstoffkonzentration

Zur Beantwortung dieser Frage standen folgende Teilziele im Mittelpunkt:

- 1.) Bestimmung des Genexpressionsprofils von Knorpelzellen im osteoarthrotisch veränderten Knorpel (Nullpunktknorpel vor Isolation) anhand ausgewählter Markergene:
 - Kollagen Typ II – Marker für Gelenkknorpel
 - Kollagen Typ I und X – Marker für Dedifferenzierung bzw. Hypertrophie der Zellen
 - Matrixmetalloproteinase-3 (MMP-3) – Marker für katabolen Knorpelstoffwechsel

2.) Charakterisierung der unter Standardbedingungen bzw. modifizierten Bedingungen aus dem osteoarthrotisch veränderten Knorpel isolierten Chondrozyten anhand der:

- Zellausbeute pro g eingesetzten Knorpelgewebes
- Synthese alkalischer Phosphatase (AP) – ebenfalls ein Hypertrohiemarker
- Expression ausgewählter Markergene (Kollagen Typ I, II, X und MMP-3)

6 Methoden

6.1 Medienzusammensetzung

Die Isolation der Knorpelzellen erfolgte insgesamt in fünf verschiedenen, nachfolgend näher beschriebenen Zellkulturmedien. Pro Patient wurden dabei jeweils zwei Medien unterschiedlicher Zusammensetzung verglichen.

Tab. 1: Zusammensetzung der Verdaummedien

Kulturmedium	Zusammensetzung für einen Liter
DMEM/F12, Ca ²⁺ -frei	4,90 g Dulbecco's MEM, Ca ²⁺ -frei (D9800, US-Biological) 5,36 g Nutrient Mixture Ham's F-12, Ca ²⁺ -frei (N8543, US-Biological) 1,96 g D-Glukosemonohydrat (C ₆ H ₁₂ O ₆ • H ₂ O) 1,20 g Natriumbikarbonat 1000 ml hochreines Wasser
DMEM/F12, Ca ²⁺ -haltig	4,90 g Dulbecco's MEM, Ca ²⁺ -frei (D9800, US-Biological) 5,36 g Nutrient Mixture Ham's F-12, Ca ²⁺ -frei (N8543, US-Biological) 1,96 g D-Glukosemonohydrat (C ₆ H ₁₂ O ₆ • H ₂ O) 1,20 g Natriumbikarbonat 500 ml hochreines Wasser 500 ml 2,1 mM Calciumchloridlösung (für 1,05mM Endkonzentration)
DMEM, phenolrothaltig (Standardverdau)	13,40 g Dulbecco's Modified Eagle Medium (D5648, Sigma-Aldrich) 3,70 g Natriumbikarbonat (NaHCO ₃) 1000 ml hochreines Wasser
DMEM, phenolrotfrei	10,00 g Dulbecco's Modified Eagle Medium Modified (D2902, Sigma-Aldrich) 3,70 g Natriumbikarbonat (NaHCO ₃) 3,85 g D-Glukosemonohydrat (C ₆ H ₁₂ O ₆ • H ₂ O) 1000 ml hochreines Wasser
Minimalmedium	9,00 g NaCl 3,70 g Natriumbikarbonat (NaHCO ₃) 0,161 g Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat (NaH ₂ P0 ₄ • H ₂ O) 0,11 g D-Glukosemonohydrat (C ₆ H ₁₂ O ₆ • H ₂ O) 1000 ml hochreines Wasser

Der pH-Wert der Kulturmedien wurde auf 7,4 eingestellt und die Medien anschließend unter sterilen Bedingungen mit dem Aminoglykosid-Antibiotikum Gentamicin versetzt (Endkonzentration: 50 µg Gentamicin pro ml Medium).

Die Kulturmedien wurden anschließend in keimfreier Umgebung (Sterilwerkbank, Fa. Nunc) durch eine Sterivex™-GS 0,22 µm Filter Einheit (Fa. Millipore) steril filtriert und bis zur Nutzung bei 4°C gelagert.

Als ein weiterer Bestandteil der Medien während der Inkubation mit Collagenase spielt der Zusatz von fetalem Kälberserum (FCS) mit einer Endkonzentration von 5 % (v/v) eine wichtige Rolle. FCS dient dabei neben der Versorgung mit Nähr- und Wachstumsstoffen auch der Inaktivierung eventuell noch vorhandener Pronase E aus dem vorangehenden, im Folgenden näher beschriebenen Verdauschritt.

Für die unter Zusatz von Hyaluronsäure durchgeführten Versuche wurde das verwendete Zellkulturmedium im Collagenaseverdauschritt (siehe Abschnitt 6.1.2.) zusätzlich mit einem Milligramm (mg) Hyaluronsäure Natriumsalz vom Hahnenkamm (H5388, Fa. Sigma-Aldrich) pro Milliliter (ml) Verdaumedium versetzt.

6.2 Zellbiologische Methoden

Der für die Experimente verwendete artikuläre Humanknorpel stammte von 16 männlichen und 30 weiblichen Patienten im Alter von 52 – 85 (68 ± 9) Jahren, die sich einer Kniegelenkoperation unterzogen (Genehmigung der Ethikkommission der FSU Jena, Bearbeitungsnummer: 1789 -05/06). Unabhängig von Alter, Geschlecht und bisheriger Krankengeschichte war die Diagnose einer Osteoarthritis (OA) des Kniegelenks mit bestehender Indikation zur Totalendoprothese-Implantation zunächst einziges Auswahlkriterium.

Die im Rahmen des Eingriffs anfallenden Knorpel-Knochen-Resektate (Tibiaplateau und Teile der Femurkondylen, s. auch Abb. 8) wurden unmittelbar nach der operativen Entnahme unter Wahrung der Sterilität in angefeuchteten Mullkompressen verpackt und in einem sterilen Behältnis bei 4°C gelagert.

Da Keimfreiheit für zellbiologische Experimente von entscheidender Bedeutung ist, erfolgten alle nachfolgend geschilderten Arbeitsschritte an einer Sterilwerkbank (Microflow Microsafe SC, Nunc). Sämtliche zur weiteren Verarbeitung des Knorpels bzw. der Chondrozyten genutzten Utensilien wurden sterilisiert (20 min bei 121°C), mit 70 %igem Ethanol (EtOH) desinfiziert bzw. abgeflammt (z.B. Pinzetten) oder waren steril verpackte Einmalartikel (z.B.

Pipettenspitzen). Verdaumemedien und Pufferlösungen wurden durch 0,2 µm- Filter steril filtriert und zusätzlich mit Gentamicin (50 µg/ml Medium) antibiotisch abgeschirmt.

6.2.1 Knorpelpräparation

Das Abschälen des Knorpels vom subchondralen Knochen erfolgte mittels Skalpell und Pinzette. Es wurde sich hierbei in erster Linie auf die makroskopisch unversehrten, hyalinen Anteile des bestehenden Restknorpels beschränkt. Die Nutzung intakter Knorpelregionen begründet sich in erster Linie in der Annahme, dort weniger stark osteoarthrotisch veränderte Chondrozyten vorzufinden. So beschränkt sich zum Beispiel auch bei der Autologen Chondrozyten Transplantation (ACT) die Entnahme auf phänotypisch intakten Knorpel aus einem nicht-tragenden Gelenkanteil. Des Weiteren ist es wahrscheinlich, dass eine mögliche Therapie in Zukunft bereits in früheren Stadien der Arthrose vollzogen wird und somit weniger stark geschädigter Knorpel zur Verfügung stehen könnte. Da bei einigen Patienten die Arthrose bereits große Teile der Gelenkflächen in Mitleidenschaft gezogen hatte, war es nicht immer möglich, die für den weiteren experimentellen Verlauf nötigen Mengen an Knorpel zu „ernten“. Ein Minimum von etwa 500 mg Knorpel (Nassgewicht) pro Versuchsbedingung war nötig um die für die Untersuchungen erforderlichen Zellzahlen (ca. 1,5 Millionen Chondrozyten) zu erreichen. Somit wurde nur ein Teil der Patienten, von denen Material zur Verfügung stand, auch tatsächlich in die Untersuchung einbezogen.



Abb. 8: Knorpel-Knochen-Präparat vor Präparation



Abb. 9: Präparierte Knorpelschuppen in PBS

Die abgeschälten Knorpelschuppen (s. Abb. 9) wurden in ca. 3 x 3 mm messende Stückchen zerkleinert und auf PBS-befüllte, abgewogene Petrischalen (Fa. Roth) entsprechend der verschiedenen Versuchsbedingungen aufgeteilt. Es wurde auf eine ausgewogene Mengen-

verteilung des Knorpels aus gleichen Regionen auf die gegenüberzustellenden Gruppen geachtet, um eine mögliche Beeinflussung der Endergebnisse durch unterschiedliche Entnahmeorte zu vermeiden.

Neben den zur Chondrozytenisolation vorgesehenen Knorpelstückchen wurden auch einige Stücken aus verschiedenen Gelenkbereichen als so genannter „Nullpunkt“ in einem 2,0 ml Reaktionsgefäß (Fa. Greiner) gesammelt, abgewogen (ca. 150 – 250 mg) und zum Teil bei -80°C für die spätere Weiterverarbeitung (RNA-Isolation) eingefroren oder die Isolation der RNA erfolgte direkt im Anschluss an die Präparation und das Ansetzen des Verdaus.

Nach Verteilung des geernteten Knorpels wurden die Petrischalen erneut gewogen und das entsprechende Knorpel-Nassgewicht für die jeweilige Versuchsbedingung ermittelt, um später Rückschlüsse auf die isolierte Zellzahl pro g verdauten Knorpels ziehen zu können.

6.2.2 Isolation der Chondrozyten aus Knorpelgewebe

Die Isolation einzelner Chondrozyten aus dem Knorpelgewebe erfolgte in so genannten Spinner-Flaschen (Wheaton Science Products), in welche die Knorpelstückchen nach dem Wiegen überführt wurden (s. Abb. 10). Im Verlauf werden diese Flaschen auch als Verdaugefäße bezeichnet.



Abb. 10: Spinner-Flasche auf Magnetrührer

Die Destruktion der Knorpelmatrix wurde zunächst in mit Pronase E (Merck KGaA, 1 mg/ml) versetzten und anschließend steril filtrierten Kulturmedien ohne Serumzusatz eingeleitet. Den Verdaugefäßen wurde entsprechend dem zuvor bestimmten Knorpel-Nassgewicht Verdauungslösung im Verhältnis von 10 ml pro 500 mg Knorpel hinzugefügt. Die Spinner-Flaschen

gewährleisteten in Verbindung mit einem Magnetrührer eine gleichmäßige Bewegung der Medien und der korpuskulären Bestandteile während der enzymatischen Verdauung.

Nach einstündiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5 %iger CO₂-Umflutung wurden die Medien vorsichtig abgesaugt und die optisch noch unversehrten Knorpelstückchen mehrfach in sterilem PBS (37°C) gewaschen, um die Pronase möglichst vollständig zu entfernen.

Im Anschluss erfolgte eine weitere ca. 22(±1)-stündige Verdauphase in den entsprechenden mit Collagenase P versetzten (0,2 mg/ml) und 5 % (v/v) FCS enthaltenden Medien.

Die nach Ablauf der Verdauzeit meist trüben Lösungen wurden auf Vollständigkeit des Verdaus hin begutachtet:

- | | |
|------------------------------|--|
| 1. vollständig (+): | makroskopisch keine Matrixreste erkennbar |
| 2. nahezu vollständig ([+]): | noch kleinste Stückchen und Fasern vorhanden |
| 3. unvollständig (-): | Knorpelstücken zum Teil nur angedaut. |

Anschließend wurden die Verdaulösungen durch ein Nylon Zellsieb (100 µm, BD Falcon™) in sterile 50ml Polypropylen-Test-Röhrchen (Fa. Greiner) überführt. Im Gegensatz zu evtl. noch vorhandenen, größeren Matrixbestandteilen können Chondrozyten dieses Sieb passieren.

Das Röhrchen wurde mit PBS (37°C) auf 50 ml aufgefüllt und das Filtrat anschließend zentrifugiert (1500 rpm, 5 Minuten (min), 25°C; Centrifuge 5804 R, Eppendorf); der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet erneut in PBS (37°C) resuspendiert. Dreimaliges Waschen dient der Entfernung kleinerer Matrixbestandteile sowie Resten der Collagenase und somit der Beendigung der Enzymwirkung.

Nach dem dritten Zentrifugengang wurde das Pellet in 2,0 ml PBS (37°C) resuspendiert und in ein 2,0 ml steriles und RNase-freies Reaktionsgefäß (Fa. Greiner) überführt. Eine fünffache Verdünnung dieser Zellsuspension (50 µl ZS + 200 µl PBS) wurde zur Bestimmung der Gesamtzellzahl verwendet.

6.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahlbestimmung erfolgte in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (s. Abb. 11). Diese besteht aus 16 Großquadraten mit je 16 Kleinquadraten. Mit Hilfe eines Handzählers wurden nach der Trypanblau-Methode die lebend erscheinenden Chondrozyten (s. Abb. 12) in beiden Diagonalen (16 Kleinquadrate) ausgezählt.

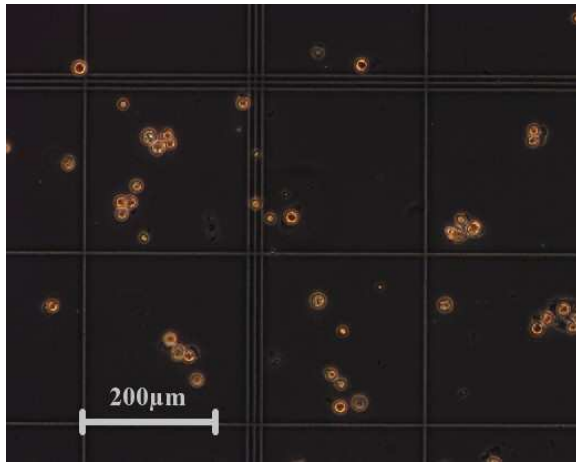


Abb. 11: Schema der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (10-fache Vergr.)

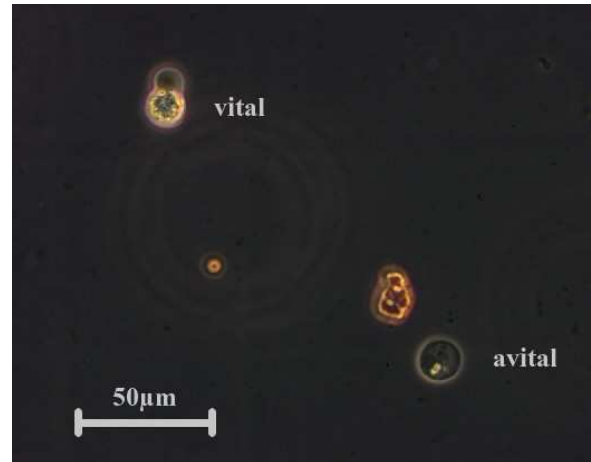


Abb. 12: Morphologie eines vitalen und eines avitalen Chondrozyten (40-fache Vergr.)

Unter Zuhilfenahme folgender Formel lässt sich so die Chondrozytengesamtzahl in der Suspension errechnen:

$$\text{Gesamtzahl} = N \times VF \times RV \times 5.000$$

[N = Mittelwert der Zellzahl in einer Diagonale, VF = Verdünnungsfaktor (hier 5),
RV = Zellsuspensions-Restvolumen in ml]

Für die Bestimmung der Alkalischen Phosphatase (AP) Aktivität wurden jeweils vier 100.000 Zellen entsprechende Aliquots der ZS pro Verdaubedingung in 2,0 ml Reaktionsgefäße überführt. Daraufhin folgte erneut die Zentrifugation aller Reaktionsgefäße (fünf pro Ansatz) bei 1.600 rpm für 5 min (Centrifuge 5415 D, Eppendorf) und vorsichtiges Pipettieren der Überstände.

Die zur AP-Messung bestimmten 100.000-Zellaliquots wurden sofort im Anschluss bei -80°C tiefgefroren. Der für die RNA-Isolation bestimmte Rest der gewonnenen Chondrozyten (zw. 0,4 – 7,9 Millionen Zellen) wurde unter RNase-freien Bedingungen (Tragen von Handschuhen, Verwendung RNase freier Utensilien) nach Herstellerangaben in 1 ml TRIzol® (Invitrogen) bis zur vollständigen Lysierung resuspendiert. (bis zu 10 Millionen Zellen pro ml TRIzol®) Die Proben wurden dann für maximal einen Monat bei -80°C gelagert (Empfehlung des Herstellers).

6.3 Biochemische Methoden

6.3.1 Bestimmung der Alkalischen Phosphatase Aktivität

Der Nachweis und die Quantifizierung der Aktivität erfolgte mit Hilfe eines AP Chemilumineszenztests (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) am Fluor-S[®]-MultiImager der Fa. Bio-Rad (Neuwirth et al. 2006).

Als Standardenzym wurde AP der Fa. Calbiochem[®] (Aktivität 33.600 units/ml) verwendet. Zu Beginn wurde eine Standard-Verdünnungsreihe a 100 µl je well auf einer 96-well-Platte (Nunc-ImmunoTM Plate, Nunc) pipettiert. Sie umfasste einen Bereich von 512,70 bis 1,00 µunits.

Anschließend wurden die bei Raumtemperatur (RT) aufgetauten Chondrozytenaliquots in 100 µl einer 0,1 % (v/v) Triton-X-100 enthaltenden TBS-Lösung resuspendiert. Triton, ein nicht-ionisches Detergenz, dient hierbei dem Aufbrechen der Zellmembranen und damit der Freisetzung der intrazellulär enthaltenen AP. Diese Suspension wurde ebenfalls vorsichtig auf die 96-well-Platte pipettiert. Dabei entstandene Bläschen wurden mit Hilfe einer feinen Nadel beseitigt, um das Auftreten von Lichtbrechungsartefakten bei der Fluoreszenzmessung zu verhindern.

Nach Auftragen von je 100µl des Chemilumineszenz-Mastermixes (Ansatz nach Angaben des Herstellers, Fa. Roche) auf Standards und Proben erfolgte ein ca. 10-minütige Inkubation bei RT, die Positionierung und Fokussierung der 96-well-Platte im „Imager“ und die Messung des emittierten Lichtes für einen Zeitraum von 500 Sekunden (s). Die von der Gerätesoftware (Quantity One, Bio-Rad) generierten Bilder wurden mit dem Programm vermessen und die Rohdaten anhand der ermittelten Standardkurve in entsprechende Enzymaktivitäten (µunits AP) pro 100.000 Zellen umgerechnet.

6.4 Molekularbiologische Methoden

6.4.1 Isolierung der RNA

Die Isolation der RNA mittels des TRIzol[®]-Reagenz, einer Phenol und Guanidiniumisothiocyanat(GITC)-Lösung. Bei diesem System handelt sich um eine Weiterentwicklung der 1987 von Chomczynski und Sacchi veröffentlichten RNA-Isolationsmethode (Chomczynski und Sacchi 1987).

6.4.1.1 RNA-Isolation aus Chondrozyten (nach Verdau)

Die RNA-Isolation erfolgte aus den während des Knorpelverdaus gewonnenen und später in TRIzol[®] lysierten Zellen. Das Protokoll entspricht weitestgehend den Herstellerangaben (TRIzol[®], Invitrogen) und beinhaltet folgende Einzelschritte:

- a. Auftauen des TRIzol[®]-Zell-Lysates und fünfminütige Inkubation bei RT
- b. Hinzufügen von 200 µl Chloroform/ml TRIzol[®], mehrfaches Schütteln und weitere Inkubation bei RT für ca. 3 min
- c. Zentrifugieren für 15 min bei 12.000 g, 4°C (Centrifuge 5810 R, Eppendorf)
- d. Nach erfolgter Phasentrennung: vorsichtiges Überführen der wässrigen, RNA-haltigen Schicht in ein neues 2,0 ml Reaktionsgefäß und Präzipitation der RNA durch Mischen mit 500 µl Isopropanol / ml eingesetzten TRIzol[®], Inkubation für 10min bei RT
- e. Zentrifugieren: 10 min, 12.000 g, 4°C (je nach RNA-Menge und Reinheitsgrad Formung eines kleinen gel-artigen Pellets am Boden des Reaktionsgefäßes)
- f. nunmehr alle Arbeiten auf Eis: Verwerfen des Überstandes und Waschen der gefällten RNA mit etwa 1 ml 75 %igem EtOH (4°C)
- g. Zentrifugieren: 5 min, 7.500 g, 4°C (Wiederholung der Schritte f und g)
- h. Verwerfen des Überstandes und bei 42°C 20 – 30minütiges Trocknen der RNA auf einem Thermoblock (ThermoStat, Eppendorf)
- i. Aufnahme des RNA-Pellets je nach Größe in 12,5 µl bzw. 25,0 µl RNase-freiem Wasser (Promega Corp.)
- j. Lagerung der RNA-Suspension bei -80°C

6.4.1.2 RNA-Isolation aus Knorpelstück (Nullpunkt)

Um ein Bild der RNA-Synthese zum Startpunkt der Chondrozytenisolation zu erhalten, fand die „Nullpunkt“ RNA-Isolation zumeist direkt im Anschluss an das Ansetzen des Knorpelverdaus statt.

Die Knorpelstücke, mit einem Gesamtgewicht zw. 150 und 250 mg, wurden zunächst in einem 2,0 ml Reaktionsgefäß (Tube) mit 1 ml TRIzol[®] Reagenz versetzt und mit einer abgeflamnten Schere maximal zerkleinert. Es wurde ein weiterer ml TRIzol[®] hinzupipettiert und der Ansatz für 15 min bei RT inkubiert.

Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt (3 min, 4°C und 12.000 g, Centrifuge 5810 R, Eppendorf). Das resultierende Pellet enthielt die Extrazellulärmatrix sowie Zellbestandteile,

während die RNA gelöst im Überstand vorlag. Dieser wurde zu gleichen Teilen (je etwa 1,0 ml) in zwei neue 2,0 ml Tubes pipettiert und wiederum für 5 min bei RT inkubiert und das Protokoll zur Isolation von RNA am Punkt b (s.o.) fortgesetzt.

Im Anschluss an die Phasentrennung wurden die Überstände beider zusammengehöriger Reaktionsgefäße wieder vereint und die RNA-Isolation folgte weiter dem oben beschriebenen Schema.

6.4.1.3 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration in den Proben (12,5 bzw. 25,0 µl) erfolgte in einer 40- bzw. 20-fachen Verdünnung. Dafür wurden entsprechend 2,5 µl (5,0 µl) der RNA-Suspension in 97,5 µl (95,0 µl) RNase-freiem Wasser resuspendiert. Nach Null-eichung mit dem zum Lösen der RNA verwendeten Wasser, wurde die optische Dichte (OD) der Proben im Spektrophotometer (Smart Spec™3000, Fa. Bio-Rad) bei 260 nm gemessen. Parallel dazu erfolgte die Messung der OD bei 280 nm, um die Reinheit der isolierten RNA über das Verhältnis der optischen Dichten bestimmen zu können. Bei reinen RNA-Präparationen liegt ein OD₂₆₀/OD₂₈₀-Quotient von 1,6 - 1,8 (Angaben der Fa. Invitrogen) vor.

Die Berechnung der RNA-Konzentration erfolgte anhand folgender Formel:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = (\text{OD}_{260} \times 1/\epsilon \times \text{VF}) / 1.000$$

[OD₂₆₀ = gemessene optische Dichte bei 260 nm, 1/ε = Proportionalitätsfaktor (für RNA = 40 µg/ml), VF = Verdünnungsfaktor der Probe (40 bzw. 20)]

6.4.2 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription werden spezifisch die mRNA-Moleküle der gewonnenen Gesamt-RNA in komplementäre DNA-Stränge (cDNA, *complementary DNA*) umgeschrieben. Dies geschah mit Hilfe der Omniscript Reversen Transcriptase (Omniscript®, Quiagen), einem rekombinant erzeugten, heterodimeren Enzym, welches in E. coli exprimiert wird.

Neben seiner Funktion als RNA-abhängige Polymerase spielt außerdem noch die Wirkung als Hybrid-abhängige Exoribonuklease (RNase H) eine wichtige Rolle. So wird jedes mRNA-Molekül nach der Synthese des komplementären cDNA-Stranges hydrolysiert und dient entsprechend nur einmal als Vorlage für den Prozess der reversen Transkription. Dies ist für die später gewünschte Quantifizierung der cDNA-Moleküle von entscheidender Bedeutung.

Das Reaktionsgemisch zur cDNA-Synthese wurde mit Reagenzien aus dem Omniscript RT Kit (Quiagen) gebildet und durch Zusatz eines Ribonukleaseinhibitors (RNase out, Quiagen) sowie Zugabe des Oligo-dT Primers ergänzt. Dieser Primer bindet spezifisch an das Poly-A-Ende von mRNA-Molekülen und ermöglicht somit deren selektive Transkription. Das Ansetzen des Reaktionsgemisches geschah, wie auch alle folgenden Schritte auf Eis.

Herstellerseits können für folgendes Protokoll zwischen 50 ng und 2,0 µg der gesamten RNA eingesetzt werden. Um ein späteres Angleichen der einzelnen Proben zu vereinfachen, wurde - wenn möglich - für jede Reaktion eine RNA-Menge von 1,0 µg pro 20 µl Ansatz gewählt.

Ein µg Gesamt-RNA wurde mit RNase-freiem Wasser auf 10 µl aufgefüllt (in PCR-Tube 0,5 ml, thin walled, Eppendorf), für 5 min bei 65°C in der RT-PCR Maschine (Mastercycler gradient, Eppendorf) denaturiert und sofort wieder auf Eis gestellt.

Es folgte die Zugabe von 10 µl des Mastermixes (Zusammensetzung siehe Tab. 2) für ein Gesamtvolumen von 20 µl. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend im Mastercycler für eine Stunde bei 37°C inkubiert, wobei die cDNA-Synthese erfolgte.

Bis zur weiteren Verwendung wurde der Ansatz dann nach 10-facher Verdünnung mit nukleasefreiem Wasser bei -20°C eingefroren.

Tab. 2: Komponenten der Reverse Transkriptase Reaktion

Komponente	Vol. / Ansatz	Endkonzentration im Ansatz
<u>Mastermix</u>		
10x Reverse Transkriptase Puffer	2,0 µl	1x
dNTP Mix (5 mM / dNTP)	2,0 µl	0,5 mM / dNTP
Oligo-dT Primer (10 µM)	2,0 µl	1 µM
RNase Inhibitor (40 U/µl)	0,25 µl	10 units / 20 µl Ansatz
Omniscript Reverse Transcriptase	1,0 µl	4 units / 20 µl Ansatz
RNase-freies Wasser	2,75 µl	
	10,0 µl	
RNA-Suspension (0,1 µg/µl)	10,0 µl	1 µg / 20 µl Ansatz
Gesamtvolumen	20 µl	

6.4.3 Quantitative Real-time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Die Real-time PCR Technologie erlaubt die quantitative Echtzeitanalyse der PCR über die Messung von laserinduzierten Fluoreszenzsignalen, wobei die Messungen am Ende und während eines jeden PCR-Zyklus erfolgen. Die Fluoreszenzzunahme im Verlauf der PCR ist durch die Interkalation von besonderen Farbstoffen (hier: SYBR[®] Green I) in die DNA-Doppelhelix bedingt. Mit dem unspezifischen Einbau der Farbstoffe in die DNA steigt deren Fluoreszenz an.

Die detektierten Fluoreszenzsignale nehmen proportional mit der durch die Taq-Polymerase gebildeten Menge an PCR-Produkten zu. In Verbindung mit definierten, genspezifischen cDNA-Standards gestattet dies Rückschlüsse auf die zu Beginn der Reaktion vorhandenen Ausgangsmengen an cDNA und erlaubt, das komplette Umschreiben der isolierten RNA vorausgesetzt, einen vergleichenden Blick auf die mRNA-Expression (Stoffwechsellage) der Chondrozyten vor und nach Verdau. (Die cDNA-Standards wurden freundlicherweise von der Forschungsabteilung des Waldkrankenhauses „Rudolf Elle“ gGmbH Eisenberg zur Verfügung gestellt.)

Die Quantifizierung eines Gens der Probe basiert auf der software-gestützten Berechnung des so genannten Schwellenwertzyklus' (*threshold cycle*, C_t -Wert) - definiert als derjenige Zyklus, in welchem das Fluoreszenzsignal erstmals als statistisch signifikant über der Hintergrund-Fluoreszenz gemessen wird (Gibson et al. 1996). Erreicht wird dieser Wert umso früher, je größer die Menge an spezifischen DNA-Vorlagen (Templates) zu Beginn der Reaktion ist.

In Abbildung 13 ist exemplarisch eine Standardkurve zur Bestimmung der Kollagen Typ I-Expression für die Versuche V23 - V26 dargestellt. Auf der x-Achse ist der dekadische Logarithmus der DNA-Ausgangszahl (*starting quantity*, SQ-Wert) abgetragen; die y-Achse zeigt korrespondierend die ermittelten C_t -Werte an. Die Standardproben unterschiedlicher Ausgangszahl sind als blaue Kreise eingezeichnet. Die automatisch erstellte Regressionsgerade, deren Formel im oberen Teil der Abbildung mit zugehörigem Korrelationskoeffizienten abgelesen werden kann, ermöglicht dann über die C_t -Werte der untersuchten Proben (rote Quadrate) die Berechnung der ursprünglichen Kopienzahl des gesuchten Gens in den jeweiligen Proben.

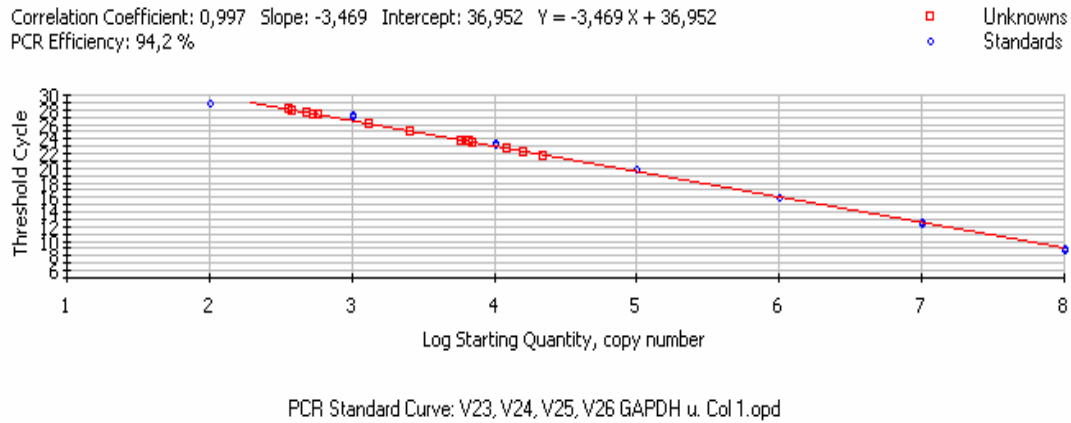


Abb. 13: Standardkurve und Proben (Koll. Typ I, iCycler, Bio-Rad)

Um die Spezifität eines jeden entstandenen PCR-Produktes zu kontrollieren, schließt sich an den eigentlichen Vervielfältigungsprozess der DNA die Erstellung einer Schmelzkurve an. Diese charakteristischen Schmelzkurven entstehen bei Abtragen des negativen Wertes der Fluoreszenzänderung gegenüber der entsprechenden Temperatur. Zu dem Zeitpunkt (der Temperatur), da sich die korrespondierenden cDNA-Stränge voneinander lösen, ist die Abnahme der Fluoreszenz entsprechend am größten und es entsteht eine produktspezifische Schmelzkurvenspitze.

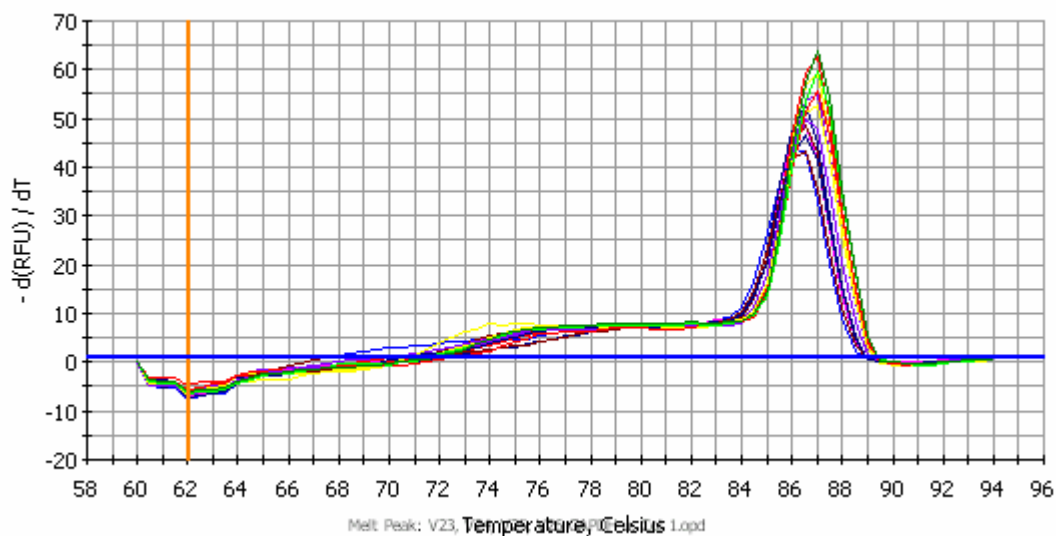


Abb. 14: Reine Standard-Schmelzkurven (Koll. Typ I), Schmelzpunkt bei 86,6°C

Die Schmelztemperatur eines Amplifikates ist von dessen Größe und Nukleotidzusammensetzung abhängig. Daher kann die charakteristische Spitze der Schmelzkurve eines PCR-Produktes mit der Schmelzkurve des zugehörigen Standards verglichen und zusätzlich von Amplifikationsartefakten, z.B. Primerdimeren, die meist bei niedrigeren Temperaturen und mit breiter Spitze schmelzen, unterschieden werden (s. Abb. 14 und 15) (Bustin 2000).

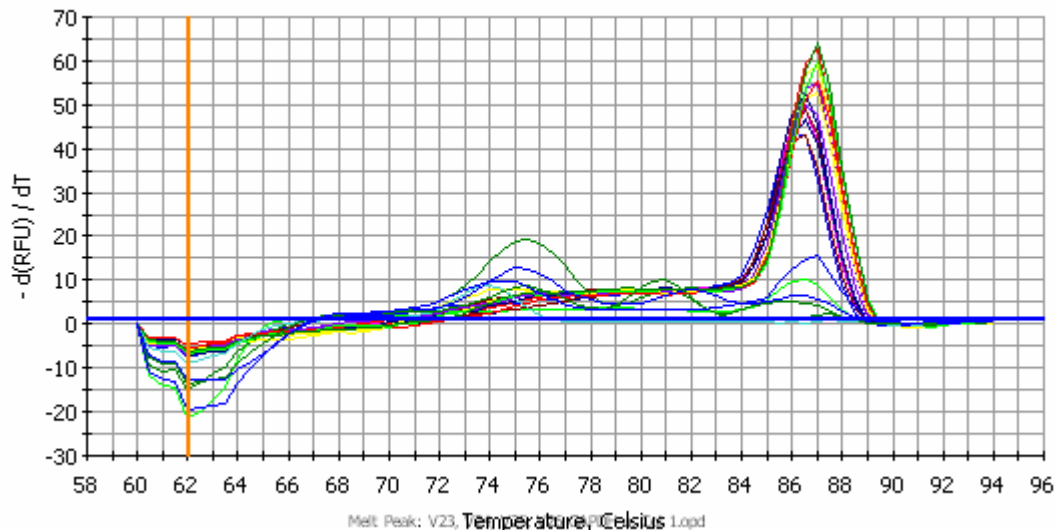


Abb. 15: Standard-Schmelzkurven (Koll. Typ I) mit Artefakt-Schmelzkurven

Zur Durchführung der qRT-PCR wurden die bei -20°C gelagerten cDNA-Proben und Standardplasmide, sowie die entsprechenden Primer und der iQTM SYBR[®] Green Supermix auf Eis aufgetaut. Nach Vortexen und kurzzeitigem Zentrifugieren aller qRT-PCR-Komponenten wurde der Mastermix (SYBR[®] Green + Primer 1 u. 2) entsprechend Tab. 3 pipettiert. Je 2 x 9,5 μl der Proben- und Standardtemplates (Doppelbestimmung) wurden nach einem vorher festgelegten und im iCycler (Fa. Bio-Rad) programmierten Schema auf eine 96-well Platte (iCycler iQTM PCR Plate, 0,2 ml, Bio-Rad) pipettiert. Im Anschluss daran wurden je 10,5 μl des Gen-spezifischen Mastermixes zu den Templates hinzupipettiert. Die PCR-Platte wurde dann mit einer speziellen Folie verschlossen und für eine Minute bei 1.000 rpm, 4°C zentrifugiert (Centrifuge 5810 R, Eppendorf).

Tab. 3: Zusammensetzung qRT-PCR Ansatz

Komponente	Vol. / Ansatz
<u>Mastermix</u>	
iQ TM SYBR [®] Green Supermix	9,9 µl
Primer 1 (10 µmol)	0,3 µl
Primer 2 (10 µmol)	0,3 µl
	10,5 µl
DNA Template (Probe/Standard)	9,5 µl
Gesamtvolumen	20,0 µl

Die Proben wurden auf die Expression folgender Gene hin untersucht:

- (1) Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als *housekeeping*-Gen
- (2) Kollagen Typ I
- (3) Kollagen Typ II
- (4) Kollagen Typ X
- (5) Matrixmetalloproteinase-3 (MMP-3, Stromelysin)

Die jeweils verwendeten Primerpaare für die PCR und Produktlängen können Tabelle 4 entnommen werden.

Tab. 4: Auflistung der für die qRT-PCR verwendeten Primerpaare

Gen	Produktlänge	Primer 1 (5' → 3') Primer 2 (5' → 3')	Annealing Temp. in °C	Referenz
GAPDH	254 bp	CAT CAC TGC CAC CCA GAA GA CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG	60,0	☼
Kollagen Typ I	509 bp	AGA CCC AAG GAC TAT GAA GT ACA TCA TTA GAG CCC TGT AG	60,0	☼
Kollagen Typ II	107 bp	CAA CAC TGC CAA CGT CCA GAT CTG CTT CGT CCA GAT AGG CAA T	63,0	(Fan et al. 2005)
Kollagen Typ X	424 bp	CCT CTT GTT AGT GCC AAC CAG GAG CCA CTA GGA ATC CTG AG	60,0	☼
MMP-3	221 bp	TGG AGA TGC CCA CTT TGA TGA TG GAG GTC CAT AGA GGG ACT GAA TG	65,4	☼

☼: Die Primer stammen aus der Forschungsabteilung des Waldkrankenhauses „Rudolf Elle“ gGmbH Eisenberg mit Lehrstuhl für Orthopädie der Friedrich-Schiller Universität Jena, wurden intern entwickelt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt

Die quantitative Real-Time PCR lief im iCycler iQTM der Fa. Bio-Rad nach dem in Tabelle 5 dargestellten Protokoll ab.

Tab. 5: qRT-PCR Protokoll

qRT-PCR Schritt	Temperatur	Dauer
Denaturierung	95°C	120 s
Denaturierung	94°C	20 s
Primeranlagerung (Annealing)	60°C	20 s
Polymerisation (Elongation)	72°C	20 s
Denaturierung	95°C	60 s
Schmelzkurvenerstellung	60°C – 95°C	jeweils 10 s in 0,5°C Schritten (70 Zyklen)
Abkühlen und Halten	10°C	∞

Die Fluoreszenzmessungen fanden kontinuierlich während der Primeranlagerung und während des Polymerisationsschrittes sowie im Rahmen der Schmelzkurvenerstellung statt.

Nach Ablauf der quantitativen Real-time PCR wurden die PCR-Platten mit den cDNA-Amplifikaten bei -20°C gelagert.

Die Auswertung der Fluoreszenzmessung erfolgte ebenfalls über die iCycler iQTM-Software. Die Ct-Werte für die einzelnen untersuchten Gene wurden anhand der mitgelaufenen Standards in so genannte SQ-Werte umgerechnet. Eine vollständige reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion vorausgesetzt entsprechen diese Werte, der Anzahl an genspezifischen mRNA-Molekülen, die in 47,5 ng ursprünglicher Gesamt-RNA enthalten war.

Die Auswertung und Beurteilung der Verdaubedingungen erfolgte dann anhand des Vergleiches der SQ-Werte für die einzelnen Gene im jeweiligen Nullpunkt sowie unter den entsprechenden Verdaubedingungen. Zusätzlich erfolgte eine Normalisierung der Genexpression von Kollagen Typ I, II und X sowie der MMP-3 anhand des *housekeeping*-Gens GAPDH und der Vergleich der entsprechenden Verhältnisse. So ließ sich neben der absoluten Quantifizierung auch der relative Anteil der einzelnen Gene an der genetischen Gesamtaktivität bestimmen und vergleichen.

In gleicher Weise wurde außerdem die Expression der Kollagene vom Typ I und X in Beziehung zur Expression des Kollagen Typ II gesetzt, anhand derer die knorpelzellspezifische Differenzierung beurteilt wird. Ein niedriger Quotient spricht für einen relativ hohen

Anteil von Kollagen Typ II und ist damit Hinweis auf ein gelenkknorpelnahes mRNA-Syntheseprofil der untersuchten Chondrozyten.

6.5 Auswertung der gewonnenen Datensätze

Die erhobenen Datensätze der verschiedenen Verdaubedingungen wurden anschließend mit dem Wilcoxon-Test statistisch miteinander verglichen. Dieser Rangsummentest (Wilcoxon Signed Rank Test) wurde gewählt, da er als parameterfreier Test geeignet ist, zwei verbundene Stichproben von Werten einer unbekannten Häufigkeitsverteilung (Medium I vs. Medium II) miteinander zu vergleichen.

Bei diesem Test werden die Differenzen der erhobenen Wertepaare (beispielsweise: Zellzahl in Medium I - Zellzahl in Medium II) anhand ihres absoluten Betrages in einer Rangreihe sortiert. Die zugewiesenen Ränge werden anschließend mit den entsprechenden Vorzeichen (z.B. je nach höherer oder niedrigerer Zellzahl) versehen. Die so markierten Rangzahlen werden dann entsprechend ihres Vorzeichens addiert und verglichen.

Gibt es keinen Unterschied zwischen beiden Behandlungen, so sollte die Summe positiver und negativer Rangzahlen einander ähnlich sein. Zeigen die Rangzahlen dagegen, wiederholt gleiche Vorzeichen so kann daraus geschlossen werden, dass z.B. die Messwerte der einen Stichprobe häufig kleiner sind als die entsprechenden Messwerte der anderen Stichprobe und somit, bei Überschreiten eines kritischen Differenzwertes ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Stichproben besteht.

Die Ablehnung der Nullhypothese (kein Unterschied zwischen den Verdaubedingungen) erfolgte für $p < 0,05$. Für die statistische Auswertung der Daten wurde das Statistikprogramm SigmaStat 3.0.1 (Fa. SPSS Inc.) verwendet.

Es wurden außerdem für jeden Verdauvergleich die relativen Verhältnisse zwischen den verglichenen Medien errechnet deren Mediane, Mittelwerte, Standardabweichungen sowie Minimal- und Maximalwerte den entsprechenden Tabellen zu entnehmen sind. Die Berechnung wurden im Programm Excel 2002 (Fa. Microsoft®) durchgeführt; die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte im Programm SigmaPlot 9.0 (Fa. Systat Software Inc.).

7 Ergebnisse

7.1 Das Ausgangsmaterial (Nullpunktbestimmung)

Bereits vor dem Beginn des enzymatischen Verdaus zeigten die entnommenen, osteoarthrotisch veränderten Knorpelproben (n = 29) für die untersuchten Parameter ein sehr heterogenes Bild mit großen interindividuellen Schwankungen. Im mRNA-Expressionsprofil der untersuchten Gene zum Beispiel waren bei den absoluten SQ-Werten (s. Abb. 16) deutliche Schwankungen im Vergleich der einzelnen Nullpunkte zu beobachten. So lag z.B. die erfasste gelenkknorpelspezifische mRNA-Synthese des Kollagen-Typ-II bei einer minimalen Kopienzahl von 125.000 bis zu maximal 28.250.000 (Schwankungsfaktor ca. 220) bezogen auf dieselbe Ausgangsmenge an Gesamt-RNA. In ähnlicher Weise unterschieden sich die Expressionslevel einzelner Proben für die anderen untersuchten Gene ebenfalls im Bereich mehrerer Zehnerpotenzen.

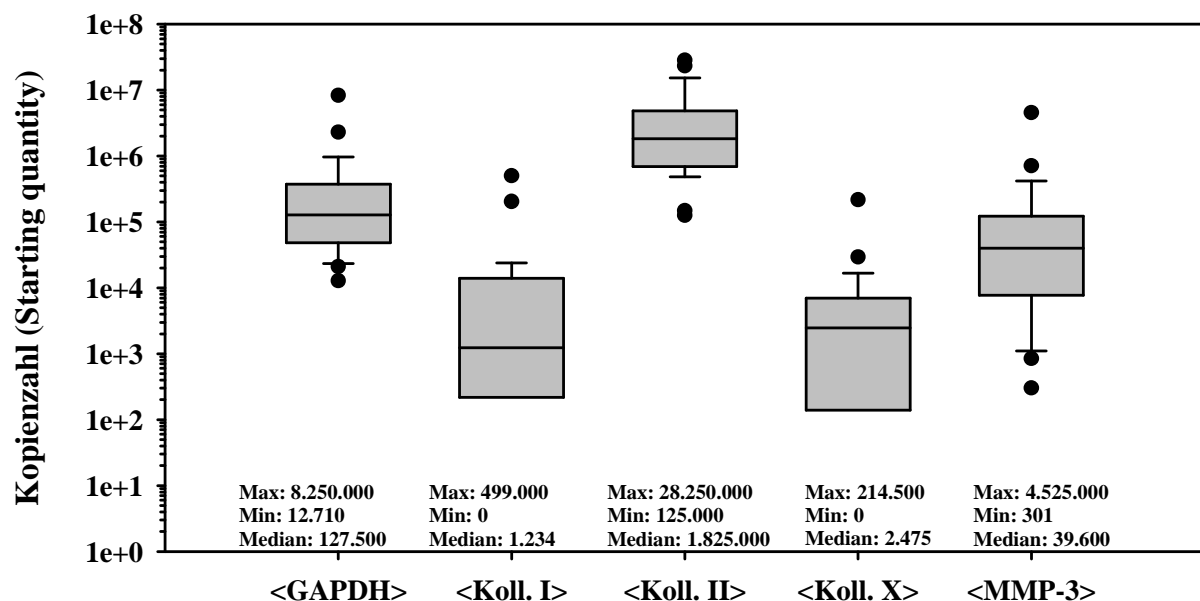


Abb. 16: Schwankungsbreite der mRNA-Genexpressionsprofile im Spenderknorpel vor Verdau (Nullpunkt), mittels qRT-PCR bestimmte, absolute Kopienzahlen für GAPDH, Kollagen Typ I, II, X und MMP-3 (Boxplotdarstellung, Angaben berechnet auf je 47,5 ng ursprünglich im RT-Schritt eingesetzte Gesamt-RNA)

Wie Abbildung 17 zu entnehmen ist, zeigten auch die gegen GAPDH normalisierten Genexpressionsverhältnisse, sofern berechenbar, große Unterschiede. Bezogen auf die Expression der MMP-3 ließ sich sogar ein bis zu 6.500-facher Unterschied zwischen Knorpelgeweben zweier verschiedener Patienten detektieren.

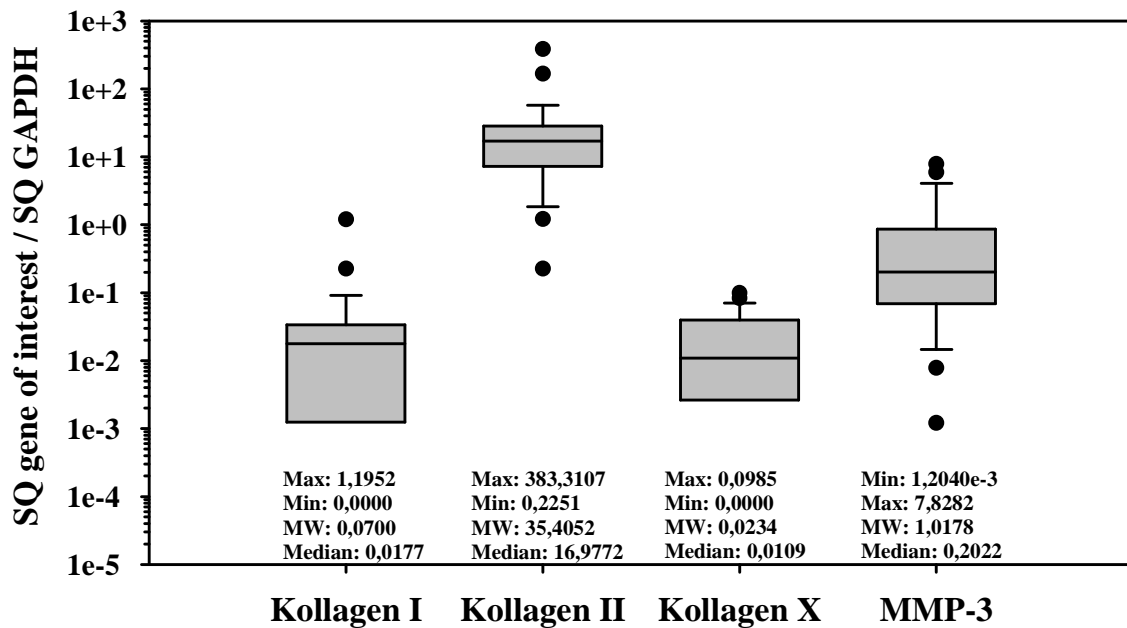


Abb. 17: mRNA-Expression der Kollagene Typ I, II, X und der MMP-3 vor Verdau (Nullpunkt), mittels qRT-PCR bestimmt, gegen GAPDH normalisiert (Boxplotdarstellung)

Entsprechend wiesen die in Abbildung 18 dargestellten mRNA-Verhältnisse des Typ-I- und Typ-X-Kollagens gegenüber der Kollagen Typ-II-Expression ebenfalls eine hohe Streuung der individuellen Werte auf. Es fällt dabei auf, dass beide Expressionswerte gleich niedrig ausfallen.

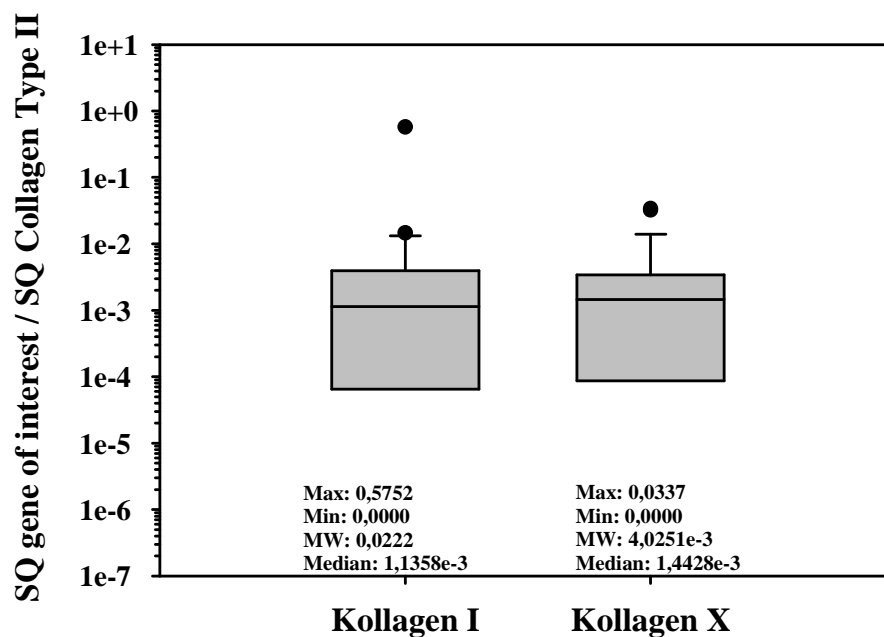


Abb. 18: Verhältnisse der mRNA-Expression von Typ-I- zu Typ-II- bzw. Typ-X- zu Typ-II-Kollagen vor Verdau (Nullpunkt)

Die spezifischen Werte der einzelnen Nullpunktbestimmungen können im Anhang der Tabelle Anhang 1 entnommen werden.

7.2 Der Standardverdau (DMEM)

Insgesamt flossen in die Betrachtung der Effekte des Standard-Über-Nacht-Verdaus aus 21 unterschiedlichen Versuchen gewonnene Datensätze ein. Sie wurden in einer Gruppe zusammengefasst und mit den entsprechenden Daten der jeweiligen Nullpunktbestimmung verglichen. Für die Datengewinnung wurde Gelenkexplantatknorpel von 9 männlichen und 12 weiblichen Patienten im Alter von 53 – 85 (67 ± 10) verwendet. Die bereits auf Ebene der Nullpunkte erfasste große individuelle Schwankungsbreite im Vergleich verschiedener Patienten (Abschnitt 7.1.) zeigte sich auch im Anschluss an den als Standard definierten enzymatischen Verdau in DMEM.

Nach der Collagenaseinkubation von $22(\pm 1)$ h waren vier Isolierungen nur unvollständig erfolgt, zehn Knorpelpräparationen zeigten einen nahezu vollständigen, sieben einen komplett erfolgten Verdau des eingebrachten Knorpels.

Es konnten zudem auch deutliche, in Abbildungen 19a und b dargestellte, interindividuelle Unterschiede der isolierten Zellzahl beobachtet werden. Die Mehrzahl der Standardisolationen erbrachte zwischen drei und sechs Millionen freie Zellen pro g verdauten Knorpelgewebes (MW: $4,2 \pm 1,6 \times 10^6$). Eine Abhängigkeit der extrahierten Chondrozytenzahl vom Alter der Spender ließ sich nicht nachweisen.

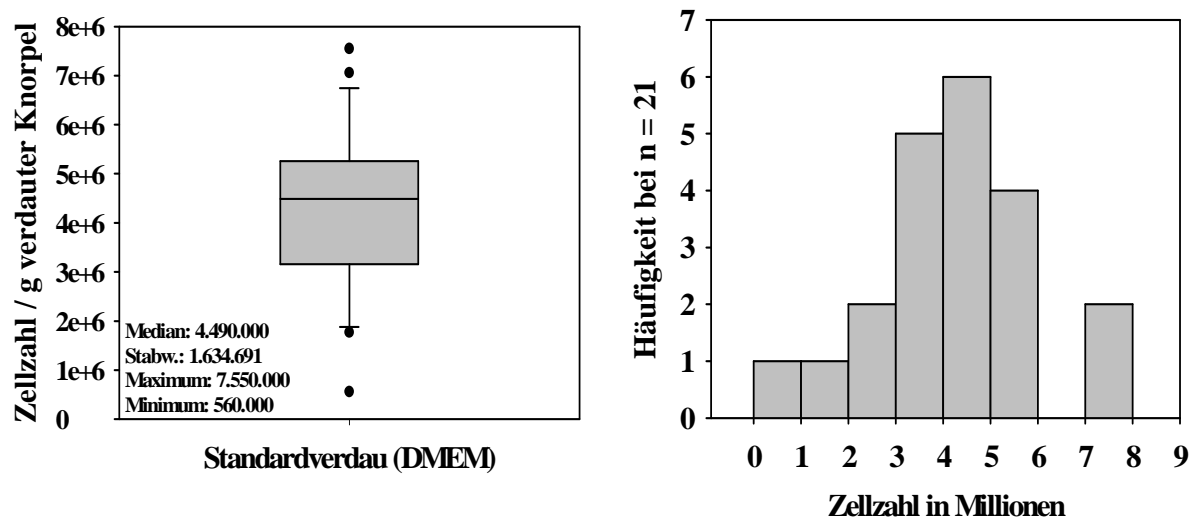


Abb. 19a u. 19b: Streuung der ermittelten Zellzahlen / g verdauten Knorpels in Standardmedium (DMEM), n = 21 (19a: Boxplotdarstellung, 19b: Häufigkeitsverteilung dargestellt in Millionenschritten)

Bis auf wenige Ausnahmen zeigte sich bei allen untersuchten Genen eine deutliche Zunahme der Genexpression nach dem Verdau. Besonders deutlich war dieses Phänomen für die mRNA-Synthese von MMP-3 zu beobachten. Hier konnten angefangen bei einer ca. 50-fachen Steigerung der Expressionsrate auch cDNA-Kopienzahlen nachgewiesen werden, welche nach Verdau dem mehr als 235.000-fachen des im Nullpunkt bestimmten Wertes entsprachen. Der Faktor der Steigerung lag im Median bei etwa 300 (s. auch Tabelle 6).

Für die Expression der Kollagene fielen die beobachteten Steigerungen moderater aus. So zeigten die bestimmten Absolutwerte im Median für Kollagen Typ I eine etwa 60-fache, für Kollagen Typ X eine rund 46-fache Erhöhung. Für Kollagen vom Typ II ergab sich im Median eine circa 7-fache Steigerung der Expression, wobei hier in 2 Versuchen sogar eine Reduktion der im Nullpunkt bestimmten Aktivität festzustellen war. Die als *housekeeping*-Gen bestimmte GAPDH wies über alle Experimente gesehen eine Expressionssteigerung, mit Median beim etwa 10-fachen des ursprünglichen Wertes auf.

Tab. 6: Verhältnis der Expression ausgewählter Gene von Chondrozyten nach Standardverdau im Vergleich zum Punkt Null der Isolation (Kopienzahl nach Standardverdau / Kopienzahl Nullpunkt)

		<u>Minimalwert</u>	<u>Maximalwert</u>	<u>Median</u>	<u>SD</u>	<u>Mittelwert</u>
Absolute Werte (SQ)	GAPDH	1,00	63,01	10,47	15,33	14,18
	Kollagen I	Ø	2.280,37	60,77	558,79	245,41
	Kollagen II	0,32	121,51	6,74	29,02	17,76
	Kollagen X	Ø	886,97	45,91	252,97	149,73
	MMP-3	48,73	235.049,83	306,48	51.021,03	13.384,58

Ø = Nachweis der Expression in der Nullpunktprobe mittels qRT-PCR nicht möglich, daher nicht kalkulierbar

Die beobachteten und in Abbildung 20 dargestellten Differenzen der Expressionswerte zwischen Chondrozyten zum Punkt Null und nach dem Standardverdau sind nach dem Wilcoxon Signed Rank Test für gepaarte Stichproben statistisch hoch signifikant ($p < 0,01$).

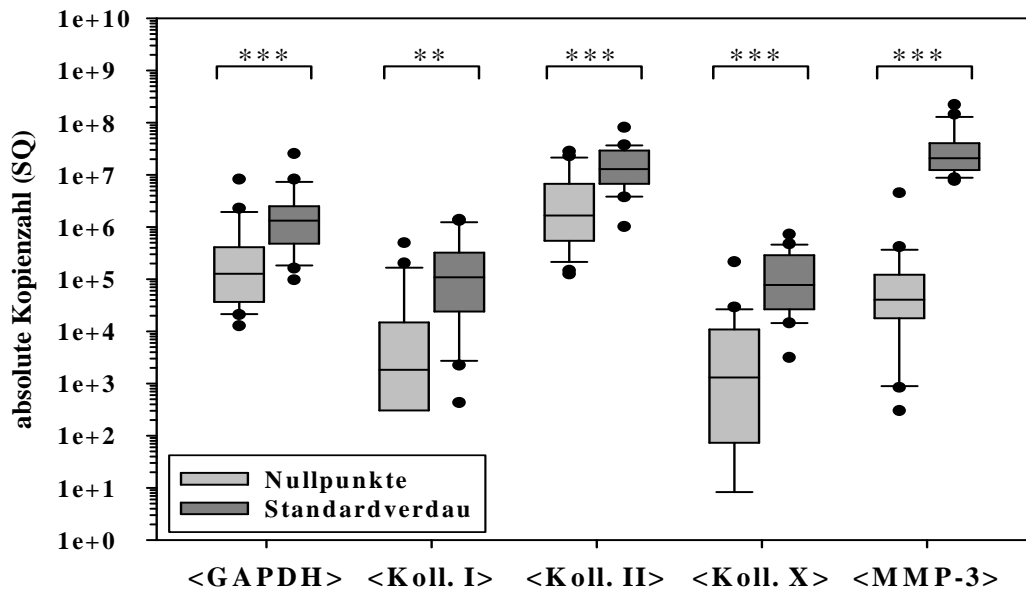


Abb. 20: Vergleich der absoluten mRNA-Expression Nullpunkte zu Standardverdau, Werte bezogen auf 47,5 ng isolierte Gesamt-RNA, statistisches Signifikanzniveau *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ im Wilcoxon Signed Rank Test

Der Vorgang der Isolation von Chondrozyten ruft offensichtlich eine globale Aktivierung der Genexpression hervor. Da ausnahmslos bei allen untersuchten Genen eine Zunahme der mRNA-Expression vom „Ruhezustand“ (Nullpunkt) zum Zeitpunkt nach Verdau zu verzeichnen war, lässt sich diese Steigerung im Sinne einer allgemeinen Stoffwechselaktivierung interpretieren. Vor dem Hintergrund dass der enzymatische Verdau die Zellen ihrer natürlichen Umgebungsmatrix beraubt und diese bestrebt sind, den Verlust auszugleichen, wird diese Reaktion verständlich.

Betrachtet man nun die bezüglich GAPDH relativierten Expressionsverhältnisse (s. Abb. 21), so wird offensichtlich, dass sowohl die anabolen Dedifferenzierungs- sowie Hypertrophie-marker (Kollagen Typ I und X) als auch der Marker für die katabole Stoffwechselseite, die MMP-3, im Vergleich zur allgemeinen Stoffwechsellage (GAPDH), eine deutliche Steigerung im Vergleich zum Nullpunktknorpel erfahren. Sie erweist sich im Wilcoxon Signed Rank Test als statistisch signifikant ($p < 0,01$).

Es fällt zudem auf, dass die Varianz der Daten bei den isolierten Zellen geringer ausfällt als bei den Nullpunktswerten.

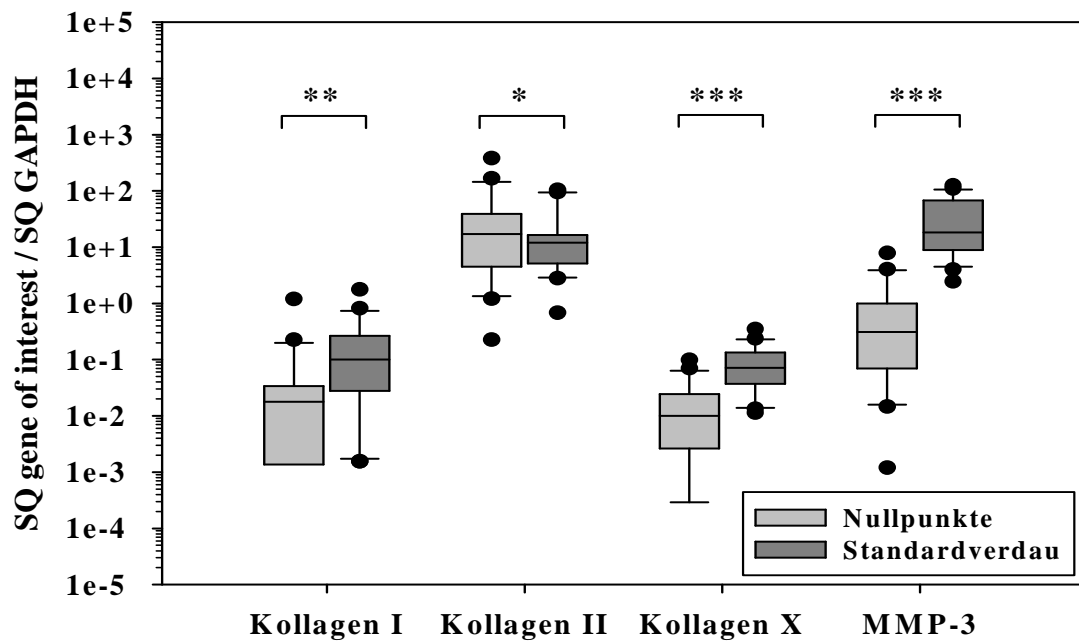


Abb. 21: Vergleich der bezüglich GAPDH normalisierten mRNA-Expression vor und nach Standardverdau, statistisches Signifikanzniveau *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ im Wilcoxon Signed Rank Test

Der relative Anteil der Expression des gelenkknorpelspezifischen Kollagen Typ II nahm leicht ab. Der Wilcoxon Signed Rank Test weist auch hier mit $p = 0,034$ auf einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der mRNA-Synthese vor und nach Standardverdau hin.

Aus Tabelle 7 können der Median sowie weitere Maßzahlen der Genexpressionsverhältnisse zwischen Nullpunkt und Standardverdau für die gegen GAPDH normalisierten Gene entnommen werden.

Außerdem sind die relevanten Maßzahlen für die Verhältnisse der Kollagene vom Typ I und X in Bezug zur Expressierung von Kollagen Typ II enthalten. So zeigten im Median sowohl der Dedifferenzierungsmarker Kollagen Typ I eine ca. 6-fache als auch der Hypertrophie-marker Kollagen Typ X eine etwa 9-fache statistisch signifikante Zunahme in Relation zur Kollagen-II-Expression ($p < 0,05$ im Wilcoxon Signed Rank Test). Abbildung 22 stellt diese Differenz vor und nach Verdau nochmals graphisch dar.

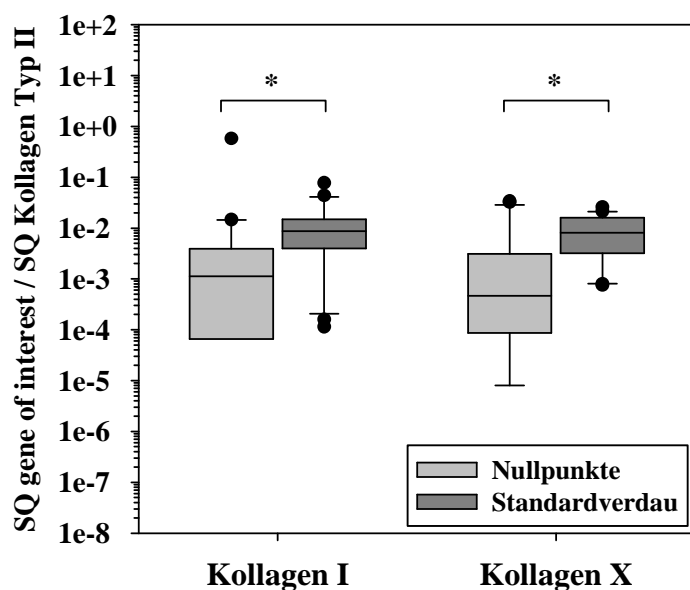


Abb. 22: Verhältnisse der mRNA-Expression von Kollagen Typ I bzw. Typ X zu Kollagen Typ II vor und nach Standardverdau, statistisches Signifikanzniveau *: $p < 0,05$ im Wilcoxon Signed Rank Test

Tab. 7: Verhältnis der bezüglich GAPDH und Kollagen Typ II relativierten Expression ausgewählter Gene (Kollagen I, II, X und MMP-3), Nullpunkt zu nach Standardverdau

			<u>Minimalwert</u>	<u>Maximalwert</u>	<u>Median</u>	<u>SD</u>	<u>Mittelwert</u>
Normalisiert auf	GAPDH	Kollagen I	Ø	204,79	4,62	57,59	28,04
		Kollagen II	0,05	38,72	0,74	8,27	2,84
		Kollagen X	Ø	86,25	6,69	20,55	12,46
		MMP-3	4,38	74.904,35	60,19	16.305,19	3.769,73
	Koll. II	Kollagen I	Ø	128,12	5,86	38,43	22,52
		Kollagen X	Ø	247,18	8,76	62,99	32,78

Ø = Nachweis der Expression in der Nullpunktprobe mittels qRT-PCR nicht möglich, daher nicht kalkulierbar

Die Bestimmung der AP nach Standardverdau zeigte wiederum eine hohe interindividuelle Schwankungsbreite. Für fünf der 21 untersuchten Chondrozytenproben nach Standardverdau konnte kein Nachweis einer AP-Aktivität erbracht werden. Demgegenüber schwankte die gemessene Aktivität der AP in den restlichen 16 Versuchen zwischen 0,12 und 199,58 μU AP pro 100.000 Chondrozyten. Der Median lag bei etwa 17,13 μU AP (Abb. 23).

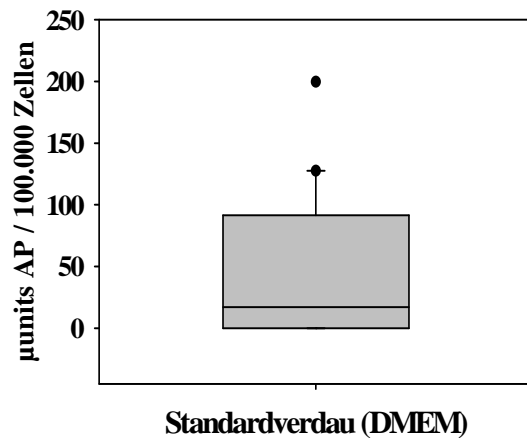


Abb. 23: Aktivität der Alkalischen Phosphatase in $\mu\text{U AP} / 100.000$ Chondrozyten nach Standardverdau (DMEM), $n = 21$

7.3 Modifizierte Verdaubedingungen

7.3.1 DMEM/F12 Ca^{2+} -haltig vs. DMEM/F12 Ca^{2+} -frei

Es wurde Knorpel von vier weiblichen und einem männlichen Patienten im Alter von 59 - 77 (69 ± 9) Jahren untersucht.

Die Verdaulösungen waren bei allen Versuchen in beiden Gruppen makroskopisch kaum voneinander zu unterscheiden. Die Verdaulösungen stellten sich getrübt und leicht gelbstichig dar und es waren vereinzelt noch kleinste Stückchen und Fasern zu beobachten, so dass der Verdau in beiden Gruppen einheitlich als nahezu vollständig ([+]) klassifiziert wurde.

Wie in Abbildung 24 dargestellt, ergab auch die Zählung der isolierten Zellen nach der Verdauphase keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Im Ca^{2+} -haltigen Verdau wurden zwischen 3,1 und 5,3 ($4,3 \pm 1,0$) Millionen Zellen, im Ca^{2+} -freien Verdau zwischen 3,5 und 5,7 ($4,2 \pm 0,9$) Millionen Chondrozyten pro g verdauten Knorpelgewebes (Nassgewicht) isoliert.

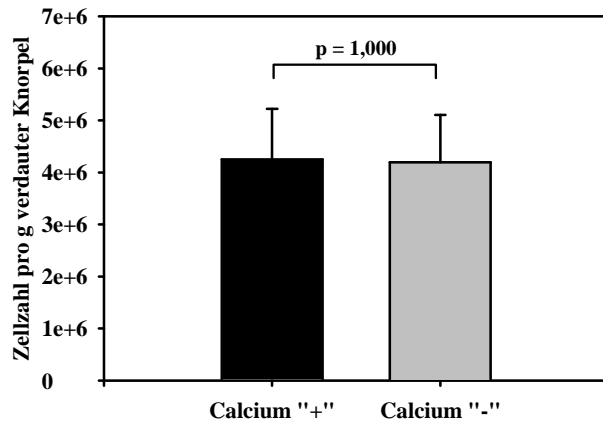


Abb. 24: Zellzahl pro g verdauter Knorpel nach Isolation in Ca^{2+} -haltigem ("+") und Ca^{2+} -freiem ("-") Medium (MW u. Stabw.), p = statistisches Signifikanzniveau im Wilcoxon Signed Rank Test

Die Bestimmung der Alkalischen Phosphatase wurde für zwei Knorpelproben (Ca1 und Ca2) als Einfachbestimmung, für die Isolationen Ca3 bis Ca5 als Vierfachbestimmung durchgeführt.

Dabei präsentierte sich das in Abbildung 25 graphisch festgehaltene, heterogene Bild, einerseits in Bezug auf die interindividuellen Schwankungen der absoluten Aktivität (5,7 – 108,0 $\mu\text{U AP} / 100.000$ Zellen), andererseits aber auch im Hinblick auf das intraindividuelle Verhalten nach Isolation in den verschiedenen Verdaumedien. So zeigten die Versuche Ca1, Ca2 und Ca3 eine relativ höhere Aktivität der AP im Ca^{2+} -freien Verdaumedium, während für die Versuche Ca4 und Ca5 nach Ca^{2+} -haltigen Verdau eine höhere Aktivität dieses Hypertrophiemarkers zu messen war.

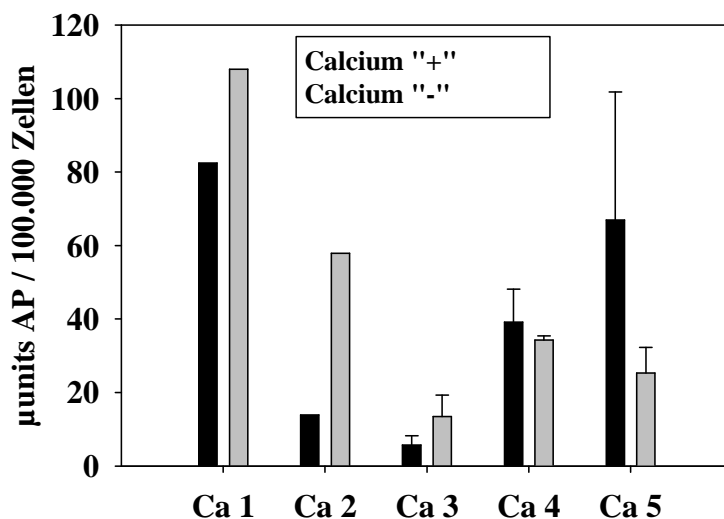


Abb. 25: Aktivität der AP in $\mu\text{U AP} / 100.000$ isolierte Chondrozyten (MW u. Stabw.) nach Patienten (Ca1 – Ca5) aufgeschlüsselt

Die entsprechenden individuellen Werte und Verhältnisse zwischen beiden Verdaubedingungen können den Wertetabellen im Anhang 4 und 5 entnommen werden.

Tabelle 8 stellt die Verhältnisse der absoluten gemessenen Kopienzahlen der einzelnen Gentranskripte zwischen Ca^{2+} -freiem und Ca^{2+} -haltigem Verdau dar. Auffällig war, dass hier bei allen Isolationen im Ca^{2+} -freien Verdau die Expression von GAPDH im Median um das ca. 2-fache, die von Kollagen des Typs X etwa um das 2,7-fache erhöht war, wenn man sie mit der mRNA-Synthese nach Ca^{2+} -haltigem Verdau vergleicht. Mit $p = 0,063$ im Wilcoxon Signed Rank Test ist für beide Gene ein Trend in Richtung einer erhöhten Transkription in Ca^{2+} -freiem Medium abzulesen.

Tab. 8: Verhältnis der absoluten Expression ausgewählter Gene von Chondrozyten nach Ca^{2+} -freiem vs. Ca^{2+} -haltigem Verdau (Kopienzahl nach Ca^{2+} -freiem Verdau / Kopienzahl Verdau Ca^{2+} -haltig)

		<u>Minimalwert</u>	<u>Maximalwert</u>	<u>Median</u>	<u>SD</u>	<u>Mittelwert</u>
Absolute Werte (SQ)	GAPDH	1,273	33,248	2,118	14,069	8,090
	Kollagen I	0,715	8.713,592	10,091	3.893,878	1.748,018
	Kollagen II	0,795	3,471	2,075	1,251	2,045
	Kollagen X	1,145	13,909	2,721	5,379	4,391
	MMP-3	0,492	15,078	1,278	6,280	3,891

Tab. 9: Verhältnis der bezüglich GAPDH und Kollagen Typ II relativierten Expression ausgewählter Gene (Kollagen I, II, X und MMP-3), Ca^{2+} -freier Verdau / Verdau Ca^{2+} -haltig

			<u>Minimalwert</u>	<u>Maximalwert</u>	<u>Median</u>	<u>SD</u>	<u>Mittelwert</u>
Normalisiert auf	GAPDH	Kollagen I	0,446	262,075	5,897	115,510	55,521
		Kollagen II	0,104	1,460	0,624	0,509	0,725
		Kollagen X	0,418	2,259	0,714	0,741	1,048
		MMP-3	0,386	0,926	0,453	0,223	0,550
	Koll. II	Kollagen I	0,866	2.510,436	6,270	1.120,393	506,234
		Kollagen X	0,422	4,007	1,441	1,565	2,160

Betrachtet man die in Tabelle 9 festgehaltenen Verhältnisse der auf GAPDH und Kollagen II relativierten Genexpressionen im Vergleich der beiden Medien, so stellt man fest, dass, gemessen am Gesamtstoffwechsel (GAPDH), die Expression von Kollagen X ein heterogenes Bild zeigt. Zwei der Isolationen wiesen ein höheres, drei dagegen ein niedrigeres Kollagen X/GAPDH-Verhältnis im Vergleich Ca^{2+} -freier zu Ca^{2+} -haltiger Verdaubedingung auf (s. auch Anhang 5).

Ähnlich regellos in der Reaktion auf die verglichenen Verdaumedien stellten sich die Kollagene vom Typ I und II in Relation zur GAPDH dar. Das MMP-3/GAPDH-Verhältnis zeigte

einheitlich eine geringfügige Reduktion im Ca^{2+} -freien Medium auf etwa 50 % der nach Ca^{2+} -haltigen Verdau ermittelten Werte. Diese liegt aber in der absoluten Zunahme der GAPDH-Expression (s.o.) und nicht in einer einheitlichen Reduktion der MMP-3 begründet.

Auch die Relativierung von Kollagen Typ I und X gegen die Expressionsveränderungen von Kollagen Typ II ließen kein einheitliches (statistisch signifikantes) Verhalten erkennen; sie zeigten aber in der Mehrzahl der untersuchten Proben einen negativ zu beurteilenden, relativen Mehranteil von Kollagen I und X im Ca^{2+} -freien Verdau.

7.3.2 DMEM Standard vs. DMEM phenolrotfrei

Beim Vergleich des Standardmediums DMEM mit einem phenolrotfreien Medium sonst gleicher Zusammensetzung fand Knorpel von drei weiblichen und vier männlichen Patienten ($n = 7$) im Alter von 53 - 79 (69 ± 10) Jahren Eingang in die Versuchsgruppe.

Die Bewertung des Verdauerfolges zeigte wiederum keine Unterschiede im Vergleich der verschiedenen Verdaumedien, wohl aber im Vergleich einzelner Patienten. Dabei waren zwei Verdaue in beiden Medien nur unvollständig erfolgt, in drei Experimenten war der Verdau nahezu vollständig und weitere zwei Versuche zeigten optisch einen vollständigen Abbau der Knorpelmatrix.

Die anschließend durchgeführte Zellzahlbestimmung (s. Abb. 26) ergab für das phenolrot-haltige Medium (P+) zwischen 1,8 und 5,3 ($3,9 \pm 1,3$) Millionen Zellen, für phenolrotfreies (P-) 4,1 bis 5,4 ($4,6 \pm 0,4$) Millionen Zellen. Die auf alle Versuche gemittelte, durchschnittlich um etwa 30 % höhere Zellausbeute für P- hielt der statistischen Überprüfung durch den Wilcoxon Signed Rank Test nicht stand ($p = 0,297$).

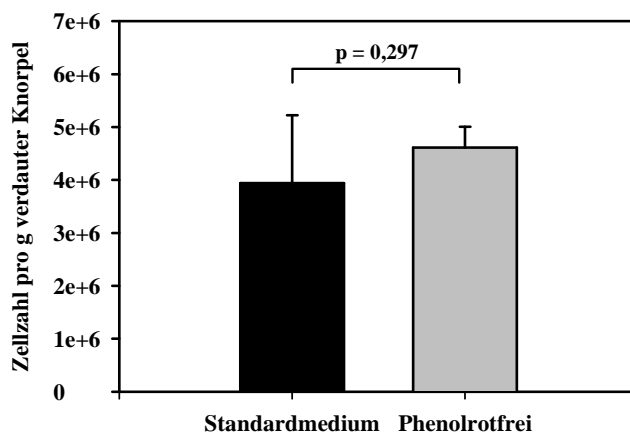


Abb. 26: Zellzahl pro g verdauter Knorpel nach Isolation in Standard- und phenolrotfreiem Medium, MW u. Stabw., p = Signifikanzniveau im Wilcoxon Signed Rank Test

Im Falle von zwei der untersuchten Patienten (P1, P3) konnte weder nach Standardverdau noch nach Isolation im phenolrotfreien Medium AP nachgewiesen werden (s. Abb. 27). Drei Knorpelproben (P4, P6, P7) zeigten bezogen auf die absoluten Werte (s. Anhang 6) kaum eine Veränderung zwischen beiden Verdaubedingungen, in zwei weiteren Experimenten (P2 und P5) erfuhr die AP eine deutliche Aktivitätszunahme im Rahmen des phenolrotfreien Verdaus.

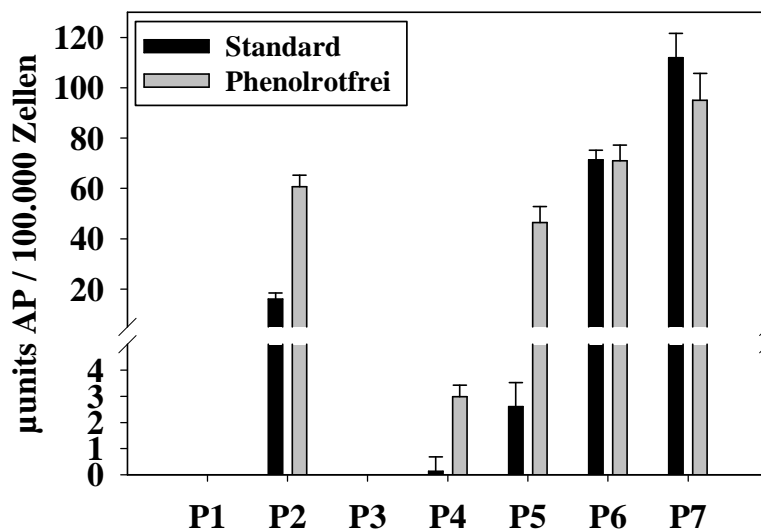


Abb. 27: Aktivität der AP in $\mu\text{U AP} / 100.000$ isolierte Chondrozyten (MW u. Stabw.) nach Patienten (P1 – P6) aufgeschlüsselt

Zusammenfassend lässt sich jedoch festhalten, dass ein statistisch signifikanter Unterschied in Bezug auf die AP nicht nachzuweisen war ($p = 0,438$).

Kollagen Typ X zeigte im Vergleich von phenolrotfreiem zu phenolrothaltigem DMEM in fünf von sieben Proben eine gesteigerte und damit im Median eine etwa um den Faktor 2,5 erhöhte Expression (s. auch Tab.10), welche der statistischen Testung jedoch ebenfalls nicht standhielt ($p = 0,578$).

Für die mRNA-Expression des Kollagen vom Typ I konnte im Vergleich phenolrotfreien und phenolrothaltigen Verdaumediums eine relative Expressionszunahme im phenolrotfreien Verdau statistisch signifikant ($p = 0,047$) nachgewiesen werden. Auch die Expression von MMP-3 war im phenolrotfreien Verdau in sechs von sieben Proben und damit ebenfalls statistisch signifikant erhöht ($p = 0,031$). Der Unterschied fiel mit einer im Median 16%-igen Steigerung jedoch vergleichsweise moderat aus.

Tab. 10: Verhältnis der Expression ausgewählter Gene von Chondrozyten nach phenolrotfreiem Verdau vs. Standardmedium (Kopienzahl nach phenolrotfreiem Verdau / Kopienzahl Standardverdau)

		<u>Minimalwert</u>	<u>Maximalwert</u>	<u>Median</u>	<u>SD</u>	<u>Mittelwert</u>
Absolute Werte (SQ)	GAPDH	0,011	2,200	0,907	0,700	1,043
	Kollagen I	0,267	8,684	2,506	2,820	3,309
	Kollagen II	0,320	3,000	1,027	0,949	1,403
	Kollagen X	0,006	4,801	2,481	1,717	2,266
	MMP-3	0,983	2,283	1,166	0,537	1,512

Die Expression der GAPDH und des Kollagen vom Typ II zeigte im Vergleich der beiden Bedingungen ein heterogenes Bild und ließ keine einheitliche Interpretation der Werte zu (s. Anhang 6).

Tab. 11: Verhältnis der bezüglich GAPDH und Kollagen Typ II relativierten Expression ausgewählter Gene (Kollagen I, II, X und MMP-3), phenolrotfreier Verdau / Standard

			<u>Minimalwert</u>	<u>Maximalwert</u>	<u>Median</u>	<u>SD</u>	<u>Mittelwert</u>
Normalisiert auf	GAPDH	Kollagen I	1,252	23,171	2,458	7,944	6,294
		Kollagen II	0,355	70,817	1,491	26,260	11,306
		Kollagen X	0,460	2,754	2,268	1,000	1,938
		MMP-3	0,705	85,182	1,750	31,632	13,406
	Koll. II	Kollagen I	0,327	4,926	2,012	1,482	2,458
		Kollagen X	0,008	4,543	1,612	1,416	1,744

Tabelle 11 können die entsprechenden Faktoren der auf die GAPDH bzw. Kollagen Typ II relativierten Genverhältnisse zwischen phenolrotfreiem und Standardverdau entnommen werden. So war z.B. das Kollagen vom Typ I im phenolrotfreien Verdau nicht nur relativiert auf die Expression von GAPDH ($p = 0,016$), sondern auch in Relation zum Kollagen Typ II ($p = 0,031$), statistisch signifikant stärker exprimiert als nach Isolation in phenolrothaltigem Medium (s. Abb. 28). Diese relative Erhöhung kann im Sinne einer vermehrten Dedifferenzierung isolierter Chondrozyten gedeutet werden.

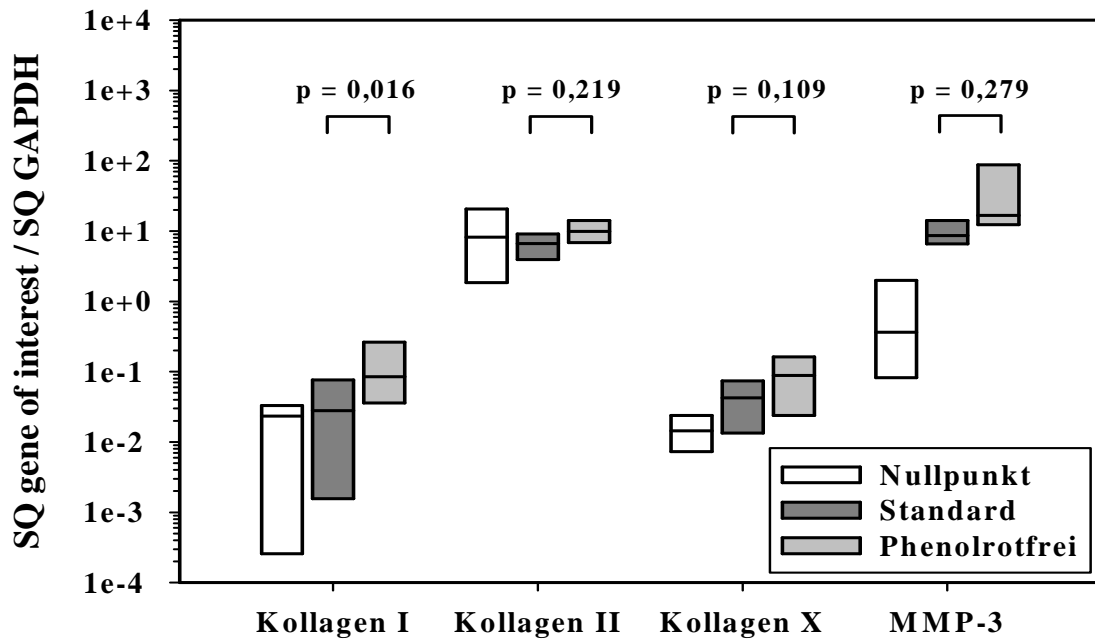


Abb. 28: Vergleich der bezüglich GAPDH normalisierten mRNA-Expression zum Punkt Null sowie nach Verdau in Standard- und in phenolrotfreiem Medium, p = statistisches Signifikanzniveau im Wilcoxon Signed Rank Test

Im phenolrotfreien Medium zeigten auch die Kollagene II und X sowie die MMP-3 über alle Versuche gemittelt eine Expressionssteigerung in Normalisierung auf die GAPDH. Diese Beobachtungen können aufgrund mangelnder statistischer Signifikanz ($p > 0,05$) jedoch nur als Trend beschrieben werden und bedürfen weiterer Untersuchungen.

Es lässt sich jedoch abschließend für diese Versuchsgruppe festhalten, dass die An- bzw. Abwesenheit von Phenolrot durchaus einen Einfluss auf die Genexpression der im Verdau befindlichen Knorpelzellen ausübt.

7.3.3 DMEM Standard vs. DMEM Standard + Hyaluronsäure

Der Einfluss des Zusatzes von Hyaluronsäure zum Standardmedium wurde in einer Gruppe von zwei weiblichen und vier männlichen Patienten im Alter von 55 bis 85 (68 ± 10) Jahren untersucht.

Es waren auch in dieser Versuchsgruppe keine Unterschiede bezüglich des Verdauerfolges zwischen den beiden verglichenen Medien zu beobachten. Zwei Versuche zeigten einen unvollständigen, drei Versuche einen nahezu vollständigen und weitere zwei Versuche einen vollständigen Verdauerfolg.

Die Zellzahlbestimmung (s. Abb. 29) ergab für das Standardmedium zwischen 0,6 und 7,6 ($3,8 \pm 2,4$) Millionen Chondrozyten, für das mit HA versetzte Medium 2,4 bis 7,4 ($4,5 \pm 2,2$) Millionen Zellen pro g verdauten Knorpelgewebes.

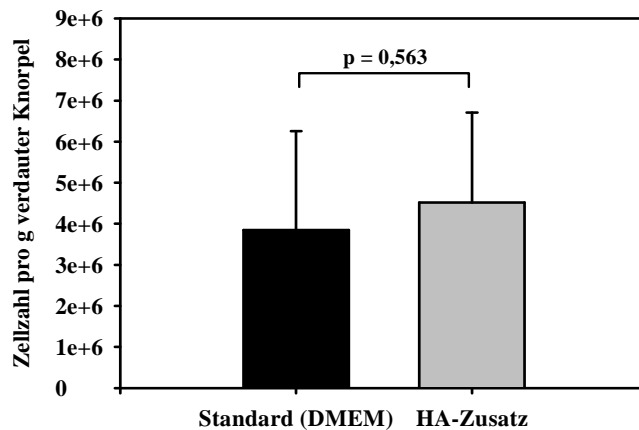


Abb. 29: Zellzahl pro g verdauter Knorpel nach Isolation in Standard- und Standardmedium mit Zusatz von HA (1 mg/ml), MW u. Stabw., p = Signifikanzniveau im Wilcoxon Signed Rank Test

Der gemittelte, vermeintliche „Mehrertrag“ auf Seiten des hyaluronsäurehaltigen Verdaus erklärt sich durch den im Versuch HA1 beobachteten Ausreißer. Hier konnten im Standardverdau gerade $0,56 \times 10^6$ Zellen isoliert werden, mit Zusatz von Hyaluronsäure jedoch ca. $7,00 \times 10^6$ Chondrozyten. Die Isolationen HA2 – HA6 hingegen zeigten zwar im mit Hyaluronsäure versetzten Verdau durchschnittlich eine um ca. 10 % reduzierte, jedoch statistisch nicht signifikant niedrigere Zellausbeute als im Standardverdau (s. Anhang 8).

Die Aktivitätsbestimmung der AP konnte aufgrund der niedrigen Zellausbeute in HA1 nur für fünf der sechs untersuchten Knorpelzellisolationen durchgeführt werden. Hierbei zeigte sich, wie in Abbildung 30 zu erkennen, ein wiederum scheinbar regelloses Bild nach Verdau.

Während in drei Experimenten (HA2 – HA4) die mit Hyaluronsäure versetzte Isolation eine ca. 1,7- bis 2,5-fach höhere Aktivität der AP als im Standardmedium zur Folge hatte, zeigte sich in den Versuchen HA5 und HA6 ein gegenteiliger Effekt mit einer Reduktion auf ca. 60 % bzw. 30 % des nach Standardverdau bestimmten Wertes.

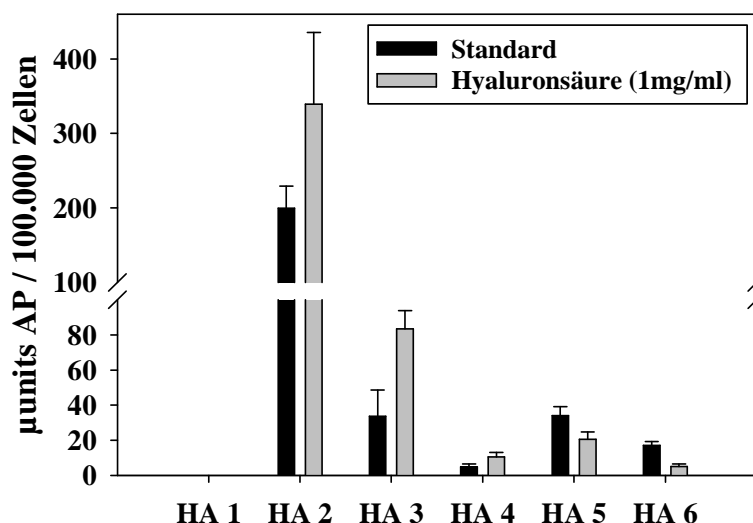


Abb. 30: Aktivität der AP in $\mu\text{U AP} / 100.000$ isolierte Chondrozyten (MW u. Stabw.) nach Patienten (HA1 – HA6) aufgeschlüsselt

Ähnlich divergent präsentierten sich die mittels qRT-PCR gewonnenen Daten. Die Expression aller untersuchten Gene zeigte sich im Verlauf der einzelnen Versuche beim Vergleich der zwei Bedingungen sehr heterogen und ließ somit auch keine einheitliche Interpretation zu. War in vier Versuchen (HA1 – 3, HA5) die MMP-3 im HA-haltigen Medium bezogen auf die absoluten Kopienzahlen noch verhältnismäßig weniger stark exprimiert (s. auch Tabelle 12), so zeigte sich dieser positive Effekt nach Relativierung gegen die GAPDH kaum noch, da auch deren Expression nach Verdau mit Hyaluronsäure im Vergleich mit dem Standardmedium weniger stark ausfiel (s. Tabelle 13).

In Relativierung auf GAPDH zeigte sich außerdem ein starker Trend ($p = 0,063$) für einen relativen Anstieg der Kollagen Typ X-Expression im mit HA versetzten Medium um etwa 40 % im Vergleich zu Standardmedium.

Tab. 12: Verhältnis der Expression ausgewählter Gene von Chondrozyten nach Standardmedium + HA vs. Standardmedium (Kopienzahl nach Verdau in Standardmedium + HA / Kopienzahl Standardverdau)

		<u>Minimalwert</u>	<u>Maximalwert</u>	<u>Median</u>	<u>SD</u>	<u>Mittelwert</u>
Absolute Werte (SQ)	GAPDH	0,450	1,251	0,773	0,331	0,798
	Kollagen I	0,355	9,985	0,812	3,758	2,361
	Kollagen II	0,278	1,658	0,957	0,484	0,986
	Kollagen X	0,675	1,771	0,935	0,442	1,097
	MMP-3	0,225	1,509	0,597	0,462	0,730

Tab. 13: Verhältnis der bezüglich GAPDH und Kollagen Typ II relativierten Expression ausgewählter Gene (Kollagen I, II, X und MMP-3), Standardmedium + HA / Standardmedium

			<u>Minimalwert</u>	<u>Maximalwert</u>	<u>Median</u>	<u>SD</u>	<u>Mittelwert</u>
Normalisiert auf	GAPDH	Kollagen I	0,658	9,235	1,344	3,324	2,528
		Kollagen II	0,618	1,767	1,184	0,399	1,224
		Kollagen X	0,960	2,276	1,402	0,451	1,444
		MMP-3	0,461	1,518	0,909	0,432	0,917
	Koll. II	Kollagen I	0,438	6,023	1,131	2,144	2,037
		Kollagen X	0,766	3,682	0,968	1,123	1,426

Zusammenfassend lässt sich auch für den Zusatz von 1 mg Hyaluronsäure pro ml Collagenaseverdaulösung festhalten, dass ein einheitlicher Effekt auf die Genexpression osteoarthrotisch veränderter Chondrozyten während des Über-Nacht-Verdaus nicht gegeben war.

7.3.4 DMEM Standard vs. Minimalmedium

In einer sechs weibliche und zwei männliche Patienten im Alter von 53 bis 84 (69 ± 11) Jahren umfassenden Gruppe wurde untersucht, welchen Einfluss auf die Isolation der Knorpelzellen bzw. den chondrozytenspezifischen Stoffwechsel ein so genanntes Minimal- oder Hungermedium im Vergleich zum Standardverdaus hat.

Bereits bei der Erfassung des Verdaueresfolges zeigten sich deutliche Unterschiede im Vergleich der beiden Medien. Während der Abbau der Knorpelmatrix im Standardmedium vollständig (4x) oder nahezu vollständig (4x) erfolgte, zeigte sich mit nur zwei nahezu vollständigen und sechs unvollständigen Verdauen eine makroskopisch deutlich schlechtere Zerlegung des Knorpels im Minimalmedium.

Diese Beobachtung deckte sich auch mit den in der Fuchs-Rosenthal-Kammer ermittelten und in Abbildung 31 dargestellten, auf 1 g Knorpelgewebe bezogenen Zellzahlen, die isoliert werden konnten. Während die Isolation in Standardmedium zwischen 2,4 und 7,1 ($4,3 \pm 1,5$) Millionen Chondrozyten erbrachte, konnten nach Verdaus in Minimalmedium nur zwischen 1,8 und 4,2 ($3,1 \pm 0,9$) Millionen Zellen „geerntet“ werden. Diese durchschnittlich um ca. 25 % niedrigere Zellausbeute erwies sich mit $p = 0,008$ im Wilcoxon Signed Rank Test als statistisch signifikant.

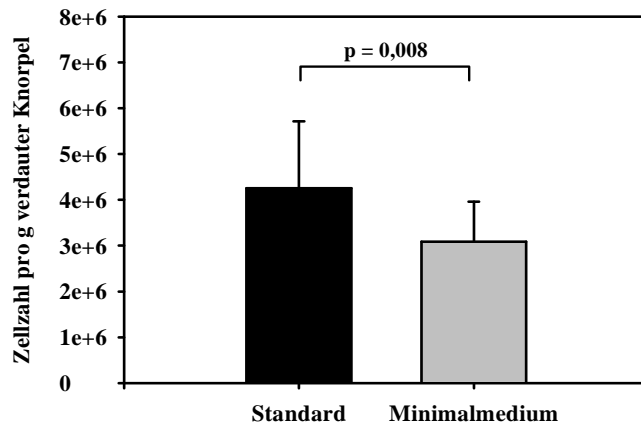


Abb. 31: Zellzahl pro g verdauter Knorpel nach Isolation in Standardmedium vs. Minimalmedium (MW u. Stabw), p = Signifikanzniveau im Wilcoxon Signed Rank Test

Eine AP-Aktivität, bezogen auf 100.000 isolierte Chondrozyten, konnte für die Versuche M5 und M7 weder nach Standardverdau noch im Anschluss an den Minimalverdau nachgewiesen werden. Ebenso war für die dem Minimalverdau entstammenden Proben der Experimente M2 und M4 keine Aktivität zu dokumentieren. (Ergebnisse dargestellt in Abb. 32)

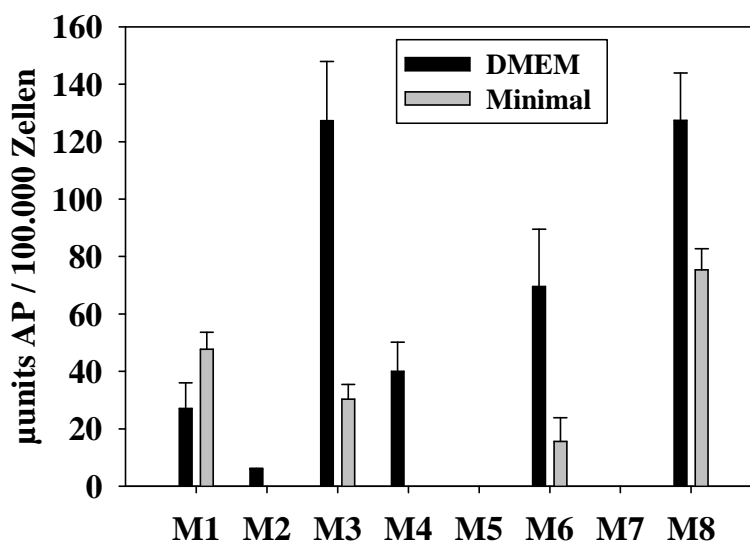


Abb. 32: Aktivität der AP in µU AP / 100.000 isolierte Chondrozyten (MW u. Stabw.) nach Patienten (M1 – M8) aufgeschlüsselt

War für M1 noch eine relativ höhere Aktivität der AP nach Verdau im Minimalmedium zu beobachten, zeigte sich für die Versuche M2 – M4, M6 und M8 eine deutlich Reduktion im Vergleich zum Standardverdau. Zwar sind die Unterschiede statistisch nicht signifikant, weisen mit $p = 0,094$ im Signed Rank Test nach Wilcoxon aber auf einen tendenziell, die Aktivität der AP unterdrückenden Effekt des Minimalmediums hin. Diese relative Suppression der AP lässt eine Deutung sowohl im Sinne der Unterdrückung einer Hypertrophieentwicklung, als auch in Form eines negativen Einflusses auf bereits existente, hypertrophe Chondrozytensubpopulationen zu.

Der suppressive Effekt fand sich, wie Abbildung 33 und Tabelle 14 veranschaulichen, nicht nur auf der Proteinebene, sondern konnte ebenso auf der Ebene der Genexpression nachgewiesen werden.

Deutliche, statistisch signifikante Unterschiede fanden sich im Vergleich der Isolationen für die Exprimierung der GAPDH sowie der drei untersuchten Kollagentypen in allen durchgeführten Versuchen. So konnte eine Reduktion der GAPDH-Expression auf ca. 35 % bis 40 % der nach Standardverdau gemessenen Werte registriert werden ($p = 0,016$). Die generell beobachtete Expressionsaktivierung vom Nullpunkt zur Bestimmung nach Enzymverdau fiel für die Kollagene im Vergleich von Minimal- und Standardmedium sogar noch geringer aus ($p = 0,008$).

Die Kollagen Typ I-Expression beispielsweise sank auf durchschnittlich 13 %, die Kollagen Typ II-Expression im Median auf ca. 17 % und die des Kollagens Typ X auf etwa 20 % der nach Standardverdau zu registrierenden Werte.

Sehr auffällig stellt sich der augenscheinlich kaum vorhandene Einfluss des Minimalverdaus auf die Expression der MMP-3 dar, deren starker Anstieg während der Verdauphase nahezu unverändert blieb, ein Hinweis darauf, dass die beobachteten Reduktionen nicht einfach durch einen Rückgang der Zellvitalität zu erklären sind.

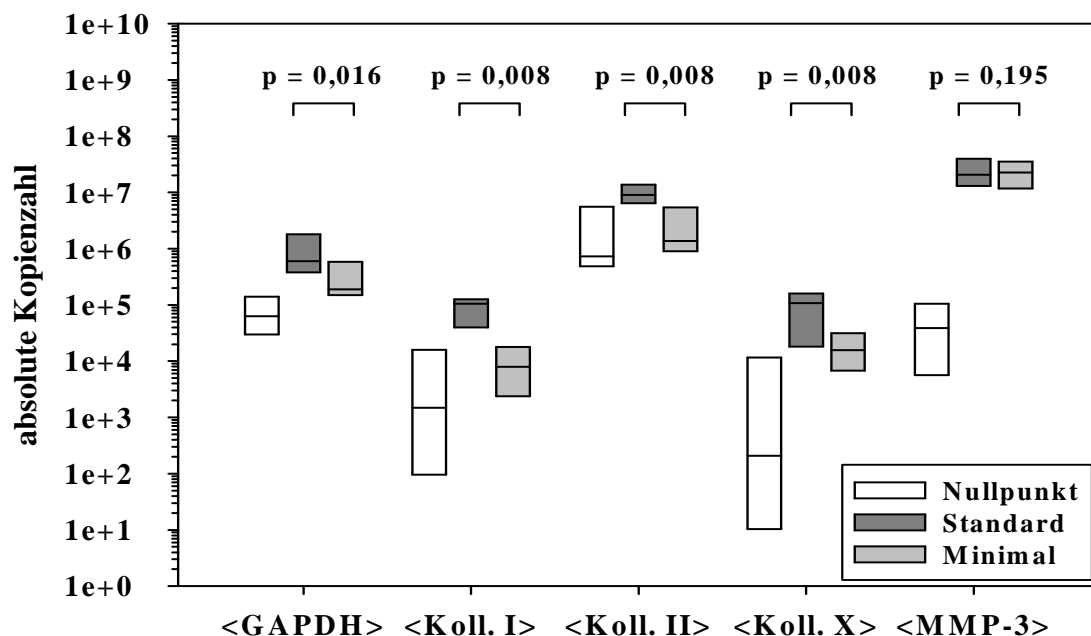


Abb. 33: absolute mRNA-Expression zum Punkt Null, nach Standardverdau und nach Isolation in Minimalmedium, Werte bezogen auf 47,5ng isolierte Gesamt-RNA, p = Signifikanzniveau im Wilcoxon Signed Rank Test

Tab. 14: Verhältnis der Expression ausgewählter Gene von Chondrozyten nach Minimalmedium-Verdau vs. Standardmedium (Kopienzahl nach Minimalmedium-Verdau / Kopienzahl nach Standardverdau)

		<u>Minimalwert</u>	<u>Maximalwert</u>	<u>Median</u>	<u>SD</u>	<u>Mittelwert</u>
Absolute Werte (SQ)	GAPDH	0,246	1,130	0,373	0,280	0,450
	Kollagen I	0,028	0,285	0,135	0,089	0,135
	Kollagen II	0,069	0,746	0,174	0,220	0,230
	Kollagen X	0,100	0,945	0,196	0,276	0,271
	MMP-3	0,667	1,599	0,902	0,272	0,981

In der Normalisierung zur GAPDH zeigt sich, dass die Kollagene im Vergleich mit dem Standard einer signifikanten Reduktion ihrer Expression unterliegen (Abb. 34). Insbesondere davon betroffen war die mRNA-Synthese des Kollagens vom Typ I, dessen Verhältnis zur GAPDH im Minimalverdau nur ca. ein Viertel dessen im Standardverdau betrug. Auch für die Kollagene vom Typ II und X zeigte sich der Effekt, allerdings in abgeschwächter Form, mit einer Verringerung auf im Mittel ca. 50 % (Tabelle 15).

Das MMP-3/GAPDH Verhältnis hingegen entsprach nach Isolation der Zellen in Minimalmedium etwa dem 2-fachen des Verhältnisses nach Standardverdau. Die Steigerung der relativen Expression war hierbei größtenteils bedingt durch die absolute Abnahme der GAPDH, wohingegen die MMP-3 in nahezu unveränderter Stärke exprimiert wurde (s. Anhang 10).

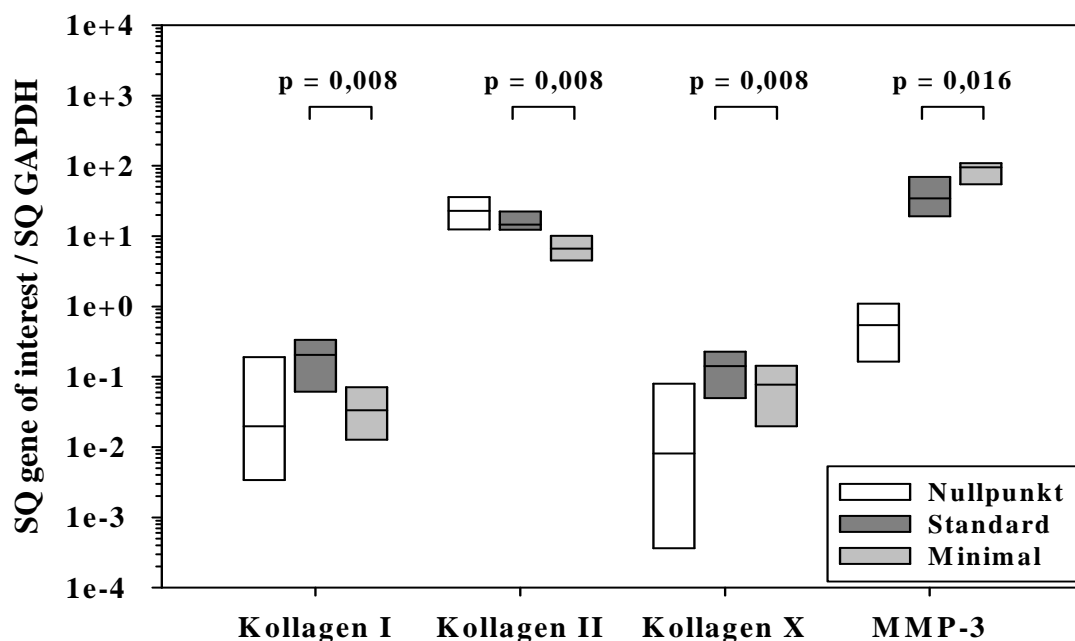


Abb. 34: Vergleich der bezüglich GAPDH normalisierten mRNA-Expression zum Punkt Null, nach Standardextraktion und nach Verdau in Minimalmedium, p = statistisches Signifikanzniveau im Wilcoxon Signed Rank Test

Tab. 15: Verhältnis der bezüglich GAPDH und Kollagen Typ II relativierten Expression ausgewählter Gene (Kollagen I, II, X und MMP-3), Minimalmedium / Standardmedium

			<u>Minimalwert</u>	<u>Maximalwert</u>	<u>Median</u>	<u>SD</u>	<u>Mittelwert</u>
Normalisiert auf	GAPDH	Kollagen I	0,068	0,881	0,234	0,280	0,348
		Kollagen II	0,182	0,742	0,525	0,204	0,472
		Kollagen X	0,264	0,836	0,568	0,178	0,544
		MMP-3	0,927	4,664	2,340	1,114	2,579
	Koll. II	Kollagen I	0,117	1,961	0,777	0,763	0,928
		Kollagen X	0,824	1,866	1,280	0,332	1,244

Das Verhältnis der Kollagene vom Typ I und Typ X bezüglich Kollagen vom Typ II zeigte, wie Tab. 15 und Abb. 35 zu entnehmen, keine statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich der beiden Medien, da die einzelnen Versuche ein wiederum heterogenes Bild lieferten. So war das Kollagen I/Kollagen II-Verhältnis in vier der acht untersuchten Proben im Minimalverdau besser, in weiteren vier Proben schlechter im Vergleich zum Standardverdau. Das Kollagen X/Kollagen II-Verhältnis zeigte in fünf Versuchen einen negativen Effekt, in drei Versuchen aber war der relative Anteil des Kollagens Typ X im Vergleich von Minimal- und Standardmedium niedriger (s. Anhang).

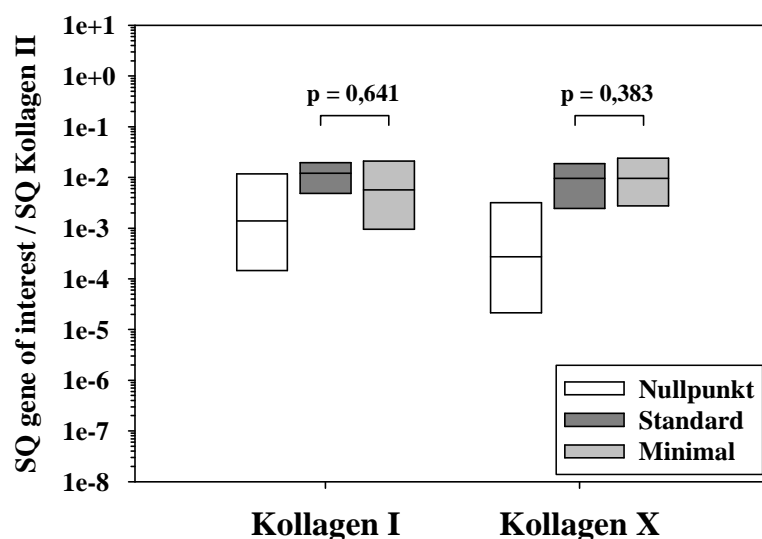


Abb. 35: Verhältnisse der mRNA-Expression von Kollagen Typ I bzw. Typ X zu Kollagen Typ II zum Punkt Null sowie nach Standard- und Verdau in Minimalmedium, p = statistisches Signifikanzniveau im Wilcoxon Signed Rank Test

8 Diskussion

In den letzten Jahrzehnten gewinnen die Methoden und Techniken des Tissue Engineering zunehmend an Attraktivität für die Behandlung degenerativer Gelenkerkrankungen. Neben der Struktur des Ersatzgewebes und dessen Funktionalität steht dabei auch ganz besonders der Ursprung der für die Konstrukte verwendeten, gewebespezifischen Zellpopulationen im Interesse der Forschungsbemühungen.

Als Goldstandard für die Knorpelrekonstruktion mittels ACT werden derzeit zumeist Zellen verwendet, welche zuvor aus dem geschädigten Gelenk gewonnen wurden. Ein wachsendes Interesse besteht dabei an der Übertragung hierbei verwendeter Verfahren und Techniken auf die Behandlung großflächiger Defekte insbesondere auch im Hinblick auf die Behandlung der Osteoarthritis (Tallheden et al. 2005).

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die Charakterisierung von Knorpelzellen vor und nach Isolation aus dem arthrotisch vorgeschädigten Gewebeverband sowie die mögliche Einflussnahme auf knorpelzellspezifische Parameter während der Verdauphase durch Variationen der Verdaumedienszusammensetzung.

Der Vergleich mit anderen, die Isolation von Knorpelzellen untersuchenden Studien gestaltete sich dabei als Herausforderung. In der zugänglichen Literatur werden eine Vielzahl voneinander differierender Verdauungsprotokolle mit unterschiedlichen Enzymen, Enzymkonzentrationen und nicht zuletzt Isolationszeiträumen beschrieben, so dass eine Gegenüberstellung der Ergebnisse nur bedingt stattfinden konnte (Kuettner et al. 1982, Jakob et al. 2003, Kaps et al. 2004, Hayman et al. 2006, Hidvegi et al. 2006).

Die für die Untersuchung gewählten Parameter zur Bestimmung des Einflusses der Zellisolationsverfahren sind dabei ein Kompromiss zwischen der Notwendigkeit objektiv messbarer Größen und deren Verfügbarkeit: Sonst übliche Verfahren zur Bestimmung zellspezifischer Stoffwechselleistungen wie Histologie, Immunhistochemie und biochemische Nachweise für die Produktion extrazellulärer Matrixkomponenten konnten nicht verwendet werden, da die Zellen unmittelbar im Anschluss an die Isolation zu untersuchen waren und somit keine Zeit für die Neusynthese von EZM verblieb. Eine Ausnahme bildete der biochemische Nachweis der intrazellulär vorhandenen AP, welche insbesondere mit dem hypertrophen Chondrozyten in Verbindung gebracht wird (Kirsch et al. 1997). Neben der Bestimmung der isolierten Zellzahl im Verhältnis zum eingesetzten Knorpelgewicht war somit die kritische Betrachtung auf der Transkriptionsebene mittels quantitativer Real-time PCR das Hauptverfahren zur Analyse der Effekte unterschiedlicher Isolationsbedingungen.

8.1 Das Ausgangsmaterial (Nullpunkte)

Die Bestimmung der Genexpressionsprofile des so genannten Nullpunktknorpels sollte einen Eindruck über die metabolische Ausgangslage des verwendeten Spendermaterials vermitteln. Hierfür und für die weiteren Experimente wurde Knorpel mit glatter Oberfläche, also ohne makroskopisch erkennbare Arthroseveränderungen, gewonnen.

Dennoch zeigte sich bereits bei der Untersuchung des frisch geernteten Knorpels in der Gegenüberstellung verschiedener Patienten ein alters- und geschlechtsunabhängiges, breites Spektrum individueller mRNA-Profile. Trotz gleicher Mengen eingesetzter mRNA umfasste die Streuung einzelner Genexpressionen den Bereich mehrerer Zehnerpotenzen, was auf individuelle Stoffwechselleistungen bzw. unterschiedliche Aktivitätszustände im Arthroseprozess hinweist (s. Anhang 1).

Auffallend war bei der Untersuchung des Ausgangsmaterials zudem die meist nachweisbare Expression der Dedifferenzierungs- bzw. Hypertrophiemarker Kollagen Typ I und X, welche in gesundem Gelenkknorpel nicht oder nur zonal beschränkt vorkommen, häufig aber auch mit dem Verlauf der Osteoarthritis in Verbindung gebracht werden (Miosge et al. 2004, Girkontaite et al. 1996). Da es sich bei dem untersuchten Knorpel um Material aus osteoarthrotisch geschädigten Gelenken handelt, steht die nachgewiesene Expression dieser Kollagentypen im Einklang mit der Literatur und bestätigt das Vorkommen entsprechender Differenzierungsvorgänge auch in scheinbar unversehrten Gelenkanteilen.

Eine mögliche Ursache der interindividuellen Schwankungen ist beispielsweise in einer vom Entnahmeort abhängigen mRNA-Synthese der untersuchten Gene zu vermuten. So beschrieben mehrere Gruppen signifikante Unterschiede im Genexpressionsprofil intakter und geschädigter Knorpelareale innerhalb eines OA-geschädigten Gelenkes (Sato et al. 2006, Aigner und Dudhia 1997). Die hier vorliegenden Ergebnisse, gewonnen aus makroskopisch unversehrtem Gelenkknorpel, können somit als ein weiteres Indiz dafür betrachtet werden, dass Veränderungen auf der Genexpressionsebene einer Schädigung der EZM vorausgehen.

Um ein quantitativ ausreichende Mengen an Gelenkknorpel für die nachfolgenden Untersuchungen bereitzustellen, wurde je nach Ausmaß und Lage der arthrotischen Veränderungen Knorpel sowohl aus tibialen als auch femoralen Gelenkanteilen gewonnen.

Das Abschälen des Knorpels vom subchondralen Knochen ist ebenfalls als Quelle von interindividuellen Unterschieden in Betracht zu ziehen: insbesondere für die Expression des Kolla-

gens vom Typ X bzw. die Anwesenheit von AP, deren Vorkommen charakteristischerweise in Knorpelabschnitten unterhalb der Tidemark beschrieben wurde (Rees und Ali 1988, Girkontaite et al. 1996, Poole et al. 2001).

Zwar wurde während der Präparation mit Pinzette und Skalpell darauf geachtet, die kalzifizierende Zone unberührt zu lassen, dennoch erwies sich das Abschälen des Knorpels in fixem Abstand zum subchondralen Knochen als schwierig. Ein variabler Einfluss einzelner Knorpelschichten bzw. darin enthaltener Knorpelzellsubpopulationen auf die Ergebnisse ist somit nicht auszuschließen.

Weiterhin wurde zwar nur Knorpelmaterial eines Patientenkollektivs (Kniearthrosepatienten mit Indikation zum Kniegelenkersatz) verwendet, die klinische Erfahrung zeigt aber, dass mitunter große Missverhältnisse zwischen subjektivem, klinischen Beschwerdebild (Leidensdruck) und objektivierbarer Gelenkdegeneration bestehen (Buckwalter und Mankin 1997b). Je nach Krankheitsdauer und -intensität kann also folglich auch von Unterschieden bezüglich der weiteren mechanischen Belastung des Gelenkes oder dem Einflusszeitraum von osteoarthroseabhängigen Mediatoren, wie z.B. von IL-1 oder Stoffwechselprodukten wie Kollagen- und Hyaluronsäurefragmenten ausgegangen werden (Goldring und Goldring 2004, Fichter et al. 2006). Die Besonderheiten der individuellen Krankheitsgeschichte spiegeln sich somit gewissermaßen auch im makroskopischen Zustand des verbliebenen Knorpelgewebes bzw. im Phänotyp, also der Syntheseleistung, der zu isolierenden Chondrozyten wider.

Einen Hinweis auf die Vielfalt individueller Gelenkknorpel bietet hierbei auch die Variationsbreite der Genexpressionsprofile, welche nach einem einheitlichen Verdauprotokoll in Standardmedium gewonnen wurden.

8.2 Der Standardverdau

Bereits die makroskopische Beurteilung des Verdauerfolges ließ auf Unterschiede im Ausgangsmaterial schließen, welche im Rahmen weiterer Untersuchungen auch nach identischer Isolation noch deutlicher hervortraten.

Sowohl die Bestimmungen der AP mit breitem Ergebnisspektrum von keiner nachweisbaren Aktivität bis zu 199,58 μ U AP / 100.000 Zellen, als auch die Bestimmung der gewonnenen Zellzahl pro g eingesetzten Knorpels mit einer bis zu 13-fachen Differenz zwischen zwei erfolgten Isolationen offenbarten deutliche interindividuelle Schwankungen.

Im Durchschnitt erbrachte das von mir verwendete Standardprotokoll mit einer Kombination von Pronase E (1 mg/ml) und Collagenase P (0,2 mg/ml) ca. $4,2 \pm 1,6 \times 10^6$ Zellen pro g Knorpelnassgewicht. Dies entspricht einer etwa doppelt so hohen Zellausbeute verglichen mit den 2004 von Kaps *et al.* bzw. 2006 von Hidvegi *et al.* veröffentlichten Daten (bis zu $1,8 \times 10^6$ Zellen / g Gelenkknorpel in einem Übernachtverdau aus Kollagenase und Hyaluronidase). Jakob *et al.* publizierten eine Arbeit, in welcher OA-Knorpel und Normalknorpel auf den Zellgehalt und den Einfluss verschiedener Verdauprotokolle für die Zellausbeute untersucht wurden. Die über histologische und biochemische Methoden bestimmte durchschnittliche Zellzahl / g OA-Knorpel lag bei ca. $13,5 \pm 2,3 \times 10^6$ Zellen. Davon konnten in einem 22-stündigen, 0,15 %igen Collagenaseverdau durch die Gruppe um Jakob bis zu $2,46 \pm 0,8 \times 10^6$ lebende Zellen extrahiert werden, was etwa $18,7 \pm 6,1 \%$ der im Gewebe enthaltenen Knorpelzellen entspricht. Die Zahlen von Jakob *et al.* (2003) zugrunde legend erreichte das von mir verwendete Standardprotokoll eine Extraktionsquote lebender Zellen von ca. $31,1 \pm 11,9 \%$ der theoretisch isolierbaren Chondrozyten.

Hayman *et al.* fanden in einem direkten Vergleich verschiedener Isolationsprotokolle ebenfalls eine Pronase-Collagenase-Kombination bzw. einen reinen 22-h-Collagenaseverdau anderen Verfahren (z.B. Trypsin-Collagenase) überlegen. Die Daten sind aber nur bedingt auf humanen Arthroseknorpel übertragbar, da von Hayman *et al.* (2006) Knorpel adulter Schlachtrinder verwendet wurde und Enzymkonzentrationen, sowie die Dauer der Isolation vom vorliegenden Standardprotokoll abwichen.

Weiterhin ist zu bedenken, dass Zellzahl und Vitalität nicht nur durch die verwendeten Isolationsenzyme, sondern auch durch die Knorpelzerkleinerung vor Verdau bzw. durch die von Protokoll zu Protokoll verschiedenen mechanischen Kräfte während der Isolation beeinflusst werden: z.B. von mir verwendete Spinnerflasche vs. 3D orbital shaker (Jakob *et al.* 2003). Auch die Selektion von Chondrozytensubpopulationen (differenziert, hypertroph, dedifferenziert) im Rahmen der Isolation ist ein möglicher Ansatz für die Frage nach dem Verbleib des Großteils der im Knorpel enthaltenen Zellen. Plausibel erscheint in diesem Zusammenhang jedoch ein Zusammenspiel aller genannten Faktoren.

Bei Betrachtung der qRT-PCR-Ergebnisse fiel in erster Linie der globale Anstieg der absoluten Expression ausnahmslos aller untersuchten Gene während der Verdauphase und im Vergleich zur Nullprobe auf, ein Effekt, der auch in allen folgenden Experimenten immer wieder beobachtet werden konnte. Die Isolation der Zellen aus dem nativen Gewebsverband ist also zunächst offenbar ein starker Stimulus für die mRNA-Synthese im Allgemeinen.

Adulte Chondrozyten, eingebettet in normalen Knorpel, zeigen zunächst nur eine geringe Stoffwechselaktivität, die der EZM-Homöostase dient. Ein umfangreiches Expressionspotential ist allerdings dauerhaft vorhanden, wie eine Reihe von Arbeiten in der Gegenüberstellung von normalem humanem Knorpel mit osteoarthrotisch geschädigtem Knorpel, beispielsweise anhand von Osteopontin oder Osteocalcin belegen (Pullig et al. 2000a, Pullig et al. 2000b). Diese Proteine kommen im gesunden Gelenkknorpel nicht vor.

Eine Erklärung für die beobachteten Expressionssteigerungen ist in einer generellen Stoffwechselaktivierung der Chondrozyten zu vermuten, mit dem Ziel der schnellen Regeneration ihrer natürlich vorhandenen Umgebung; denn die Interaktion mit der EZM ist essentiell für Morphologie und die gelenkknorpelspezifischen Funktionen der Zellen (vgl. Kap. 5.2). Durch den Verlust der EZM werden möglicherweise ursprünglich supprimierte Gene wieder angeschaltet. Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise der im FCS enthaltene Insulin-like-growth-factor-1 stimulieren hierbei die Matrixsynthese. Dies geschieht offensichtlich unkoordiniert, so dass für Gelenkknorpel untypische und teilweise unerwünschte Genexpressionen zu verzeichnen sind.

Besonders auffällig war in diesem Zusammenhang die signifikante Zunahme der relativen Expression der Kollagene Typ I und X im Vergleich mit der ebenfalls gemessenen Mehrexpression von GAPDH (Nullpunkt vs. Bestimmung nach Standardverdau). Diese im Median 4,5- bzw. 6,5-fache Steigerung der Dedifferenzierungs- bzw. Hypertrophiemarker steht im Kontrast zu der im Großteil der untersuchten Proben aufgetretenen, relativen Expressionsminderung des gelenkknorpelspezifischen Kollagens vom Typ II - im Median um ca. 25 %.

Es kommt also im Rahmen der Zellisolation zu einer Verschiebung zu Gunsten einer gelenkknorpelunspezifischen Genexpression.

Einen Grund für die Expressionsveränderungen der Kollagene vom Typ I bzw. Typ X könnte neben der isoliert verstärkten Induktion der entsprechenden Gene durch begünstigende Verdaubedingungen auch die möglicherweise spezifische Extraktion einzelner, prädisponierter Knorpelzellsubpopulationen darstellen, welche für die destruktiven Wirkungen des enzymatischen Verdaus weniger anfällig sind. Die Untersuchung dieser Hypothese würde jedoch eine gegenwärtig noch nicht vorhandene Methode der gezielten Markierung und Beobachtung von Chondrozytensubpopulationen voraussetzen. Derzeit muss sich die Untersuchung also auf die Beschreibung des Gesamtbildes beschränken.

Die stärkste Zunahme auf Transkriptionsebene erfuhr im Vergleich von Nullpunktkontrolle und Standardisolation die MMP-3 als kataboler Stoffwechselmarker. In ausnahmslos allen

Versuchen zeigte sich eine deutliche Steigerung der zu registrierenden Expression, die auch in Relativierung auf die GAPDH im Median mit einem mehr als 60-fachen Zuwachs dokumentiert werden konnte.

Wie bereits vermutet (vgl. Kap. 5.4) stellt also offensichtlich die Isolation der Chondrozyten aus ihrer natürlichen Umgebung auch für den katabolen Arm des Zellstoffwechsels einen starken Reiz dar.

In der Zusammenschau der Ergebnisse zum Standardverdau fiel zudem auf, dass die Varianz der individuellen Daten bei den isolierten Zellen geringer ausgeprägt war als bei den Nullpunkten, ein Hinweis auf eine größere Homogenität bzw. zunehmende Angleichung der isolierten Knorpelzellen durch die in-vitro-Bedingungen.

Schon die Betrachtung dieser wenigen Parameter nach der verhältnismäßig kurzen Isolationszeit verdeutlicht eindrucksvoll den Effekt der Zellextraktion aus Nativgewebe und unterstreicht die Bestrebungen, bereits durch Manipulation der Isolationsbedingungen die Differenzierungsfähigkeit von Chondrozyten positiv beeinflussen zu können bzw. negative Einflüsse des Knorpelverdaus zu minimieren.

8.3 Modifizierte Verdaubedingungen

8.3.1 *DMEM/F12 Ca²⁺-haltig vs. DMEM/F12 Ca²⁺-frei*

Die Ergebnisse der Isolation in Ca²⁺-freiem verglichen mit Ca²⁺-haltigem Medium waren nur schwierig einzuordnen, da vergleichbare Studien an humanem Material in der Literatur nicht ausfindig zu machen waren.

Die interindividuell wiederum stark unterschiedlichen Ausgangslagen (Nullpunkt) des verwendeten Spenderknorpels zeigten im Vergleich auch nach der Isolation eine wenig einheitliche Reaktion auf den Verdau. Eine Ca²⁺-spezifische Beeinflussung der AP-Aktivität konnte ebenso wenig nachgewiesen werden, wie ein Einfluss auf die Zahl isolierter Chondrozyten.

Auf molekularbiologischer Ebene ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden untersuchten Verdaubedingungen, aber einige tendenzielle Veränderungen. So ist z. B. die im Ca²⁺-haltigen Verdau einheitlich beobachtete verminderte Expression der GAPDH, sowie des Kollagens vom Typ X zu erwähnen.

Letztere steht im Kontrast zu der Beobachtung der Gruppen um Wang (2001) sowie Bonen *et* Schmidt (1991), welche über eine Ca²⁺-dosisabhängige Zunahme des mRNA-Niveaus für

Typ-X-Kollagen berichteten. Ebenso ließ sich das von Deshmukh *et al.* 1976 beschriebene Ca^{2+} -abhängige Umschalten der Kollagensynthese vom Typ II auf den Typ I, zumindest auf Ebene der mRNA-Expression nicht bestätigen. Vielmehr verschlechterten sich die Verhältnisse von Typ-I- zu Typ-II-Kollagen sowie des Typ-X- zu Typ-II-Kollagen unter den Ca^{2+} -freien Verdaubedingungen oder blieben unverändert.

Die gewonnenen Daten decken sich dagegen mit Ergebnissen einer 1999 veröffentlichten Publikation von Chang *et al.*, in welcher niedrigere Ca^{2+} -Konzentrationen zu einer gesteigerten Genexpression von Kollagen Typ II, X und AP in einer Zellkultur chondrogener Rattenzellen führten. Die Übertragbarkeit dieser, wie auch der weiter oben erwähnten Studien, auf die humane Zellsituation bleibt jedoch fraglich, da die entsprechenden Daten an Zellen tierischen Ursprungs und wesentlich geringeren Alters gewonnen wurden.

Die bei allen Versuchen dieser Gruppe erhöhte GAPDH-Expression nach Ca^{2+} -freiem Verdaup deutet auf eine im Vergleich mit Ca^{2+} -haltigem Medium noch größere Aktivierung des postdigestiven, zellulären Stoffwechsels hin. In ihrer negativen Auswirkung auf die Kollagenverhältnisse zu Ungunsten des gelenkknorpelspezifischen Phänotyps erscheint diese jedoch nicht erstrebenswert, so dass die Isolation in Ca^{2+} -freiem Medium aus Sicht der jetzigen Ergebnisse nicht empfohlen werden kann.

8.3.2 DMEM Standard vs. DMEM Phenolrotfrei

Phenolrot als pH-Wert-abhängiger Indikatorfarbstoff und häufiger Zusatz in Zellkulturmedien besitzt eine große strukturelle Verwandtschaft mit nichtsteroidalen Östrogenen und legt somit eine Funktion als Ligand an entsprechenden, bereits auch auf Chondrozyten nachgewiesenen Östrogenrezeptoren nahe (Berthois *et al.* 1986, Ushiyama *et al.* 1999, Egerbacher *et al.* 2002). Der Vergleich des Standardverdaumediums mit einem phenolrotfreien DMEM wies bezüglich der Zahl isolierter Zellen keinen signifikanten Unterschied auf.

Die Bestimmung der Alkalischen Phosphatase zeigte auch in diesem Telexperiment die interindividuelle Heterogenität. Aufgrund der deutlich gesteigerten AP-Aktivität in einigen phenolrotfreien Isolationen erscheint diese Bedingung im Vergleich jedoch nicht vorteilhaft.

Daten der qRT-PCR, wobei nach dem Verdaup in phenolrotfreiem DMEM insbesondere das Kollagen vom Typ I (2-fach) und auch die MMP-3 (um 16%) signifikant höher exprimiert waren, untermauern diese Interpretation. Zudem fand sich in der Mehrzahl der phenolrotfreien Isolationen zusätzlich eine im Median um den Faktor 2,5 gesteigerte mRNA-Synthese des Typ-X-Kollagens. Auch das Verhältnis von Kollagen Typ I zu Kollagen Typ II offenbarte mit einer signifikanten Zunahme im Vergleich zum Standardmedium einen deutlichen Hinweis

auf eine Verschlechterung der gelenkknorpelspezifischen Differenzierung im Rahmen des phenolrotfreien Verdaus.

In der Literatur bislang nicht beschrieben, ließ sich in diesem Experiment eindrucksvoll der vermutete Einfluss von Phenolrot auf die Genexpression von Chondrozyten demonstrieren. Die Anwesenheit des pH-Indikatorfarbstoffes scheint dabei schon während der kurzen Phase der Isolation eine Wirkung auf den Phänotyp der Chondrozyten zu haben.

In weiteren Experimenten sollte eine mögliche Konzentrationsabhängigkeit der beobachteten Effekte untersucht werden, ebenso wie die zu vermutende Beeinflussung durch Phenolrot auch im Verlauf der Kulturphase.

Die Identifizierung des entsprechenden „Phenolrotrezeptors“ bzw. die Bestätigung, dass es sich dabei tatsächlich um die bereits beschriebenen Östrogenrezeptoren- α und/oder - β handelt und in Folge die Suche nach alternativen Möglichkeiten der Stimulation mit Steroiden oder Analoga könnten einen viel versprechenden Weg darstellen, die Stoffwechselleistungen kultivierter Chondrozyten auf diese Weise in Zukunft positiv zu beeinflussen.

8.3.3 *DMEM Standard vs. DMEM Standard + Hyaluronsäure*

Der protektive Einfluss von Hyaluronsäure (HA) auf den Knorpelzellstoffwechsel ist in der Literatur bereits in einer ganzen Reihe von Arbeiten (s. Kap. 5.4.3) beschrieben und bot somit einen interessanten Ansatz für die Modifikation des Isolationsverfahren.

Der Zusatz von HA zum Standardverdaumedium für die verschiedenen Knorpelproben zeigte im Vergleich zum reinen Standardmedium bezüglich Zellzahl und Aktivität der AP keine signifikanten Unterschiede. Neben den interindividuellen Schwankungen war daher in dieser Versuchsreihe kein einheitlicher Einfluss durch HA-Zusatz zu erkennen.

In Versuch HA1 ließ sich ein deutlicher Unterschied bezüglich der isolierten Zellzahl festhalten, wobei in der Nachbetrachtung zwei Fehlerquellen plausibel erscheinen: Einerseits eine akzidentelle Verunreinigung/Fehldosierung der Bestandteile des Standardmediums mit entsprechender zytotoxischer Wirkung, andererseits ein möglicher Zellverlust im Rahmen der postdigestiven Waschvorgänge. Letztere scheinen auch für die zumeist etwas niedrigeren Zellzahlen im HA-versetzten Verdaumedium verantwortlich zu sein, da der HA-Zusatz eine höhere Viskosität bedingt und somit die Sedimentationsgeschwindigkeit der Zellen während der Zentrifugation beeinflusst.

Auch zu den publizierten Daten von gesteigerter Kollagen-Typ-II-Synthese sowie der Suppression von Typ-I-Kollagen unter dem Zusatz von HA niedriger Konzentrationen (0,1, 0,5

bzw. 1 mg/ml) in bovinen Alginatkulturen (Akmal et al. 2005) bzw. humanen Monolayer- und Kollagenmatrixkulturen (Ehlers et al. 2001) zeigte sich im Anschluss an den Verdau in HA-versetztem Medium kein entsprechendes Korrelat. Die erhoffte einheitliche Beeinflussung von Kollagensynthese und Produktion von MMP-3 auf mRNA-Ebene war nicht zu beobachten. Es zeigte sich vielmehr erneut ein heterogenes Bild ohne signifikante Unterschiede nach Auswertung der PCR-Ergebnisse.

Da die zitierten Daten zum Einfluss von Hyaluronsäure ausschließlich im Rahmen der Zellkultur gewonnen wurden (signifikante Unterschiede nach vier bzw. neun Tagen), ist möglicherweise der Zeitraum der Isolation (22h) zu kurz, um entsprechende Effekte hervorzubringen. Bei der vorliegenden Untersuchung wurde eine HA-Konzentration von 1 mg/ml Verdaumedium verwendet. Untersuchungen von Voigt *et al.* bestätigten diese Daten, zeigten aber bei einer niedrigeren Konzentration von 0,1 mg/ml ein signifikant günstigeres Verhältnis von Kollagen Typ II zu Kollagen Typ I (Voigt et al. 2008).

Für die nachfolgende Phase der Zellkultivierung mit dem Ziel von Proliferation und Entwicklung von Chondrozyten mit gelenkknorpelspezifischer Differenzierung bleibt die Zugabe von HA zum Isolations- und Kulturmedium aufgrund der Literaturdatenlage (vgl. Kap. 5.4.3) sicherlich auch weiterhin ein interessanter Ansatz in der Arbeit mit arthrotisch vorgeschädigtem Gelenkknorpel.

8.3.4 DMEM Standard vs. Minimalmedium

Der Verdau in Minimalmedium wies einige deutliche Unterschiede im Vergleich mit der Standardisolation in DMEM auf. Der stark reduzierte Abbau der Knorpelmatrix im „Minimalverdau“ spiegelte sich beispielsweise in einer durchschnittlich um 25 % niedrigeren Zellausbeute wider. Diese lag im Mittel mit $3,1 \pm 0,9$ Millionen isolierten Chondrozyten pro g Knorpel aber noch immer über den von Kaps, Jakob und Hidvegi publizierten Zellzahlen (Kaps et al. 2004, Jakob et al. 2003, Hidvegi et al. 2006). Trotz identisch eingestellter pH-Werte der zu vergleichenden Verdaumedien erscheint die Collagenaseaktivität im Minimalmedium vermindert und so der Abbau der EZM behindert. Möglicherweise ist ein Mangel freier, bivalenter Kationen im Medium (z.B. Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+}) für diesen Effekt verantwortlich, da die Aktivität des Zink-Metalloenzym Collagenase unter anderem Ca^{2+} -abhängig ist (Head und Yankeelov 1976, Bond und Van Wart 1984).

Die AP, mittels Chemilumineszenztest bestimmt, zeigte im Vergleich zum Standardverdau eine deutliche Aktivitätsminderung nach Isolation im Minimalmedium. Dies könnte im Zusammenhang mit der reduzierten Zellzahl einen Selektionsdruck gegen die Anreicherung

hypertropher Chondrozyten bedeuten oder auf eine reduzierte Hypertrophieentwicklung der isolierten Knorpelzellen hinweisen.

Ein entsprechendes Korrelat fand sich nach Auswertung der PCR in der mRNA-Expression des Kollagens Typ X. Die absolute Quantifizierung erbrachte für den „Minimalverdau“ im Median nur noch ca. ein Fünftel der nach Standardverdau bestimmten Mengen und zeigte somit eine deutlich geringere Aktivierung. Auch die Kollagene Typ I und II offenbarten einen statistisch signifikant niedrigeren ($p = 0,008$) Expressionsanstieg auf 13 % bzw. 17 % der nach Standardisolation ermittelten Werte.

Die für den Standardverdau zu beobachtenden deutlichen Unterschiede zum Nullpunkt waren z. B. für die GAPDH sowie die Kollagene Typ I, II und X nach Isolation in Minimalmedium statistisch nicht mehr sicher feststellbar. Es ist also offensichtlich möglich, über die Nährstoffzufuhr den chondrozytenspezifischen Stoffwechsel zu beeinflussen und die Zellen zumindest in Bezug auf anabole Markergene näher an ihrer Ausgangslage zu halten.

Eine Sonderstellung nahm in dieser Versuchsgruppe die MMP-3 ein. Als Beispielmarker für die Aktivierung kataboler Stoffwechselvorgänge zeigte sich interessanterweise ihre Expression im Vergleich durch die Glukosereduktion unbeeinflusst und wurde im Vergleich mit dem Standardverdau auf konstant hohem Niveau exprimiert. Kollagenfragmente, die im Verlauf zweifelsohne Bestandteil der Verdaulösung sind, wurden bereits in der Vergangenheit mit einer gesteigerten Expression von Matrixmetalloproteinasen in Verbindung gebracht; insofern befinden sich die beobachteten Ergebnisse im Einklang mit der vorliegenden Literatur (Jennings et al. 2001, Fichter et al. 2006).

Der Verdau in Minimalmedium unterdrückt also keineswegs alle metabolischen Vorgänge im Zellinneren, sondern hat eine selektive Wirkung auf spezielle mRNA-Syntheseleistungen der Knorpelzellen. Ob die Arretierung der mRNA-Exprimierung in Bereichen nahe des so genannten Nullpunktknorpels tatsächlich einen Vorteil für die weitere Expansion der Zellen, den Aufbau extrazellulärer Matrix sowie deren Strukturierung unter optimierten Kulturbedingungen mit sich bringt, ist noch offen. Dies ist neben der Optimierung der Zellausbeute sowie der anhaltenden Aktivierung der mRNA-Synthese von MMP-3, einer möglichen Translation und der eventuellen konsekutiven Störung der Matrixneosynthese von entscheidendem Interesse für zukünftige Forschungsbemühungen auf diesem Gebiet.

Abschließend ist festzuhalten, dass der enzymatische Verdau in einem Medium mit reduziertem Nährstoffangebot an die Zellen (in dieser oder einer weiter verbesserten Form) eine mögliche Alternative zu den üblichen Zellisoliationsverfahren für die Chondrozytengewinnung darstellt. Der Erhalt des bradytrophen Chondrozytenmetabolismus über die Nährstoff-

zufuhr ermöglicht im Gegensatz zu der von Hidvegi et al. (2006) untersuchten Temperaturerniedrigung den Einsatz matrixspaltender Enzyme in ihrem Temperaturoptimum und damit verbundenen eine effizientere Isolation von Knorpelzellen.

Im Anschluss an die „sensitive Verdauphase“ könnten sich so im weiteren Kulturverlauf, dann unter optimalen Bedingungen (Abwesenheit von Matrixfragmenten, gutes Nährstoffangebot und beispielsweise artifiziell hergestellte 3D-Matrices), Vorteile bei der Zellexpansion und im Aufbau einer gelenkknorpelspezifischen EZM ergeben.

8.4 Schlussfolgerungen

Bei der Bestimmung des Genexpressionsprofils von Knorpelzellen im osteoarthrotisch veränderten Ausgangsknorpel anhand ausgewählter Markergene zeigte sich, dass trotz makroskopisch vergleichbarer Knorpelqualität drastische Unterschiede in der spezifischen Syntheseleistung der ortsständigen Chondrozyten bestehen. Die Qualität der Knorpelproben aus makroskopisch unversehrten, scheinbar normalen Zonen des betroffenen Gelenks und damit die Qualität der extrahierten Zellen kann daher nur extrem schwer vorhergesagt werden. Angesichts der beträchtlichen Anzahl der hier bereits untersuchten Proben ($n = 29$) ist es fraglich, ob die Vorhersagequalität bzw. die Einteilung in Subgruppen von „Knorpelausgangslagen“ durch die Berücksichtigung von Krankheitsgeschichte, Behandlung, Lokalisation und Ursprungsort des verwendeten Knorpelmaterials oder durch vorherige Feinbiopsien aus dem heterogenen Knorpel deutlich verbessert werden kann. Auch die Entwicklung von individuell auf den jeweiligen Restknorpel abgestimmten Isolations- und Kulturverfahren erscheint eher schwierig. Als Konsequenz muss entweder bei Gewinnung aus Defektzonen des betroffenen Gelenks eine eingeschränkte Qualität der Zellen in Kauf genommen werden oder die Extraktion der Zellen muss aus gesundem Spenderknorpel anderer Gelenke erfolgen, allerdings mit der Folge eines deutlich invasiveren operativen Vorgehens.

Die Daten belegen außerdem, dass bereits die Phase der Zellisolation mittels Pronase-Collagenase-Enzymverdau in DMEM (Standardbedingungen) einen kritischen Einfluss auf den chondrozytenspezifischen Stoffwechsel hat. So zeigten alle untersuchten Gene eine deutliche Expressionssteigerung, wobei eine Verschiebung der mRNA-Synthese vom gelenkknorpeltypischen Phänotyp (Kollagen Typ II) in Richtung einer Dedifferenzierung (Kollagen Typ I) bzw. Hypertrophieentwicklung (Kollagen Typ X) und eine im Vergleich zum Ausgangsknorpel sehr hohe Expression der MMP-3 zu beobachten war.

Allerdings resultierte das in der vorliegenden Arbeit verwendete Standardisolationsprotokoll in einer vergleichsweise höheren Zellausbeute als andere Protokolle (z.B. Jakob et al. 2003, Kaps et al. 2004, Tallheden et al. 2005, Hidvegi et al. 2006), ohne dass jedoch in dieser Arbeit ein direkter Vergleich der verschiedenen Methoden erfolgte.

Letztlich zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass eine Optimierung der Zellisolation möglich ist, speziell durch die Modifikation des für den enzymatischen Verdau verwendeten Isolationsmediums. Dabei führten der Zusatz von Phenolrot bzw. die Verwendung eines glukosereduzierten Minimalmediums zu einer Minimierung der Veränderungen der Chondrozyten bei der Isolierung aus dem Gewebe, während Ca^{2+} -freies Medium bzw. der Zusatz von Hyaluronsäure keine positive Wirkung hatten. Allerdings war im Falle des Minimalmediums immer noch eine Aktivierung kataboler Metabolismusparameter zu beobachten und auch die Zellausbeute war geringer als beim Standardmedium, so dass weitere Verbesserungen der Bedingungen bei der Zellisolierung angestrebt werden sollten. Außerdem erscheint nunmehr die Beantwortung der Frage von hohem Interesse, ob die Vorteile bei der Zellisolierung sich auch in einem chondrozytenspezifischen Phänotyp, Stoffwechsel, Signal-, und Proliferationsverhalten in der anschließenden Kulturphase widerspiegeln und somit die Gewinnung von besser geeigneten Zellen für die therapeutische ACT ermöglichen.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass die Zellausbeute nur ein Parameter für die erfolgreiche Extraktion von Chondrozyten aus dem Gelenkknorpel ist und dass sich der chondrozytäre Phänotyp durch Modifikationen des Verdaumediums positiv beeinflussen lässt. Damit bietet sich bereits in der Phase der Zellisolation die Chance, den Zellstoffwechsel zu optimieren, um in der anschließenden Phase der Kultivierung ein knorpelspezifisches Expressionsprofil zu begünstigen.

9 Materialien

9.1 Laborgeräte und allgemeiner Laborbedarf

Analysenwaage Sartorius BP 121 S	Sartorius AG, Göttingen
Autoklav Systec V-120	Systec GmbH Labortechnik, Wettenberg
Bakterienschüttler Thermoshake	Fa. Gerhardt, Königswinter
Begasungsbrutschrank INCO2	MEMMERT GmbH & Co. KG, Schwabach
Countdown Timer Oregon Scientific TR 118	Oregon Scientific Deutschland GmbH, Neu-Isenburg
Eismaschine Scotsman AF 80 WS	SCOTSMAN, Mailand, Italien
Erlmeyerkolben, Schott, versch. Größen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Fluor-S [®] -MultiImager	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gefriergeräte:	
Gefriertruhe (-80°C)	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
GS 801 (-20°C)	Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen
Kühlschrank KT 1740	Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen
Löffel/Spatel aus Edelstahl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Magnetrührer Variomag [®] Compact HP 1	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Magnetrührer Typ MR 1000	Fa. Heidolph, Kelheim
Magnetstabentferner	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Messzylinder Duran [®] , versch. Größen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Mikroskope:	
Axiovert 25	Zeiss, Jena
Axiovert 200M	Zeiss, Jena
Mittelringmagnetstäbchen, versch. Größen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
OP-Schere, spitz-spitz	Aesculap, B.Braun Melsungen AG, Melsungen
pH-Meter HI 8014	HANNA Instruments, Kehl am Rhein
Pipetten:	
Research [®] 2.5, 10, 100, 1000, 5000 µl	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Reference [®] 10, 100, 200, 1000 µl	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Handdispenser HandyStep [®]	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
Pipettierhilfe pipetus [®] standard	Hirschmann Laborgeräte GmbH&Co. KG, Eberstadt
Pinzetten (chirurgisch, anatomisch)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Peristaltikpumpe (XX8023ELO)	Millipore Corporation, Bedford, MA, USA
qRT-PCR-Maschine, iCycler iQ [™]	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Reinstwassersystem Typ HP 6 UV/UF	TKA - Wasseraufbereitungssysteme GmbH, Niederellbert
Rotilabo® -Kombi Racks 4 in 1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
RT-PCR-Maschine: Mastercycler gradient	Eppendorf, Wessling-Berzdorf
Spektrophotometer Smart Spec™3000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Quarzküvette	Bio-Rad Labs, Hercules, CA, USA
Spinner-Flaschen (50 ml, 125 ml)	Wheaton Science Products, Millville, NJ, USA
Spülautomat G7783 MIELABOR	Miele, Gütersloh
Sterile Werkbänke:	
Microflow Laminar Flow Workstation	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Microflow Microsafe SC	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Thermoblock Thermo Stat plus	Eppendorf, Wessling-Berzdorf
Vakuumpumpen:	
Dymax 30	Charles Austen Pumps Ltd., Byfleet, Surrey (GB)
Atmoport	ATMOS Medizintechnik GmbH & Co.K
Vierkantflaschen: versch. Größen Schott	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Vortexer Vortex-Genie 2® Model 560E	Scientific Industries Inc., Bohemia, N.Y., USA
Waage Kern GS 4100 - 2	Kern TECHLAB GmbH, Erkerode
Wärmeschrank UE 400	MEMMERT GmbH & Co. KG, Schwabach
Wasserbad WB 22	MEMMERT GmbH & Co. KG, Schwabach
Zählkammer Fuchs-Rosenthal	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Zentrifugen:	
MiniSpin® mit Rotor F45-12-11	Eppendorf, Wessling-Berzdorf
Centrifuge 5415 D, Rotor F45-24-11	Eppendorf, Wessling-Berzdorf
Centrifuge 5804 R, Rotor A-4-44	Eppendorf, Wessling-Berzdorf
Centrifuge 5810 R, Rotor F45-30-11	Eppendorf, Wessling-Berzdorf
Rotor A-4-62	Eppendorf, Wessling-Berzdorf

9.2 Verbrauchsmaterialien

96-well Platten:	
Nunc-Immuno™ Plate	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
iCycler iQ™ PCR Plate, 96 well, 0.2 ml	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bacillol® AF	Bode Chemie, Hamburg
Baktolin®	Bode Chemie, Hamburg
Dismozon® pur	Bode Chemie, Hamburg
Einmalskalpell, chirurgisch (#10, #11)	Aesculap, B.Braun Melsungen AG, Melsungen

Einmalhandschuhe

NOBA Verbandsmittel Danz GmbH&Co.KG,
Wetter

Filter:

FP 30/0,2 CA-S, Rotrand, steril

Schleicher&Schuell Microscience GmbH, Dassel

Sterivex™ -GS 0,22 µm Filter Einheit

Millipore Corporation, Bedford, MA, USA

BD Falcon™, Zellsieb 100 µm Nylon, steril

BD Biosciences Europe, Erembodegem, Belgien

Laborglasreiniger Neodisher® A8

Dr. Weigert GmbH & Co. KG, Hamburg

Pasteurpipetten lange Form (230 mm)

Hecht-Assistent, Karl Hecht KG, Sondheim

Petrischalen

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Pipettenspitzen:

epT.I.P.S. Reloads (10, 200, 1000 µl)

Eppendorf AG, Hamburg

Plastibrand (10, 200, 1000 ml)

Brand GmbH + Co. KG, Wertheim

PP-Test Röhrchen Cellstar® (15 ml, 50 ml)

Greiner, Bio-One GmbH, Frickenhausen

Reaktionsgefäße:

2,0 ml

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

PCR-Tube 0,5 ml (thin walled)

Eppendorf AG, Hamburg

Safe-Lock Tubes 0,5 ml

Eppendorf AG, Hamburg

Serologische Pipetten

1 ml in 1/100

BD Labware Europe, Le Pont De Claix, Frankr.

5 ml in 1/10

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

10 ml in 1/10

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

25 ml in 2/10

Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Spezialsalz für Geschirrspüler CLARAMAT

SüdSalz, Bad Friedrichshall

Spritze, 50ml

Alaris™ Medical UK Ltd., Hampshire, GB

Sterilisationsklebeband für Dampfsterilisation

A. Hartenstein GmbH, Würzburg

Sterillium®

Bode Chemie, Hamburg

Vernichtungsbeutel aus Polypropylen

Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Wägeschalen (7 ml, 100 ml)

A. Hartenstein GmbH, Würzburg

Wasser:

Nukleasefrei

Promega Corporation, Madison, WI, USA

Ampuwa®

Fresenius Kabi Deutschland GmbH,

Bad Homburg v.d.H.

Verschlussfolie für PCR-Platten

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

9.3 Chemikalien

2-Propanol	Merck KGaA, Darmstadt
Alkalische Phosphatase (D27123)	Calbiochem [®] , Merck KGaA, Darmstadt
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol (100%), unvergällt	Apotheke im KH „Rudolph Elle“ gGmbH, Eisenberg
D(+)-Glukose-Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat (reinst)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid (min. 45%)	Merck KGaA, Darmstadt
Salzsäure 25%	Merck KGaA, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck KGaA, Darmstadt
Triton [®] X-100	Merck KGaA, Darmstadt
TRIZol [®] Reagent	Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Trypan Blau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

9.4 Zellkultur

Cholecalciferol (C1357)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Collagenase P, > 1,5 U/mg	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dulbecco's MEM, Calcium frei (D9800)	US Biological, Swampscott, MA, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium Modified (D2902)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D5648)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Fetal Bovine Serum (Lot 94K3397)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Gentamicin 50mg/ml (Lot 3091324)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hyaluronsäure Natriumsalz vom Hahnenkamm (H5388)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Nutrient Mixture Ham's F-12 (N8543)

US Biological, Swampscott, MA, USA

Calcium frei

Pronase E, 4 µU/g

Merck KGaA, Darmstadt

9.5 Lösungen

PBS:

137 mM NaCl

8,3 mM Na₂HPO₄

2,7 mM KCl

1,5 mM KH₂PO₄

Lösen in Reinstwasser

Einstellung des pH auf 7,4 mit konz. HCl

Sterilfiltration mit 0,22 µm Filtereinheit

Lagerung bei 4°C

TBS:

150 mM NaCl

50 mM Tris

Lösen in Reinstwasser

pH-Einstellung auf 7,5 mit konz. HCl

Lagerung bei RT

Tritonlösung:

TBS (pH = 7,5)

0,1 % Triton-X-100 (v/v)

Lagerung bei RT

10 Literaturangaben

- Aicher WK, Gaissmaier C. 2003. Ausblicke und Zukunftsperspektiven für die Autologe Chondrozytentransplantation. In: Fritz J, Aicher WK, Eichhorn H-J, Hrsg. Praxisleitfaden der Knorpelreparatur. Aufl. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York,
- Aigner T, Dudhia J. 1997. Phenotypic modulation of chondrocytes as a potential therapeutic target in osteoarthritis: a hypothesis. *Ann Rheum Dis*, 56 (5):287-291.
- Aigner T, Gluckert K, von der Mark K. 1997. Activation of fibrillar collagen synthesis and phenotypic modulation of chondrocytes in early human osteoarthritic cartilage lesions. *Osteoarthritis Cartilage*, 5 (3):183-189.
- Aigner T, Bertling W, Stoss H, Weseloh G, von der Mark K. 1993. Independent expression of fibril-forming collagens I, II, and III in chondrocytes of human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest*, 91 (3):829-837.
- Akmal M, Singh A, Anand A, Kesani A, Aslam N, Goodship A, Bentley G. 2005. The effects of hyaluronic acid on articular chondrocytes. *J Bone Joint Surg Br*, 87 (8):1143-1149.
- Ala-Kokko L, Prockop DJ. 2001. Collagen and Elastin. In: Ruddy S, Harris ED, Jr., Sledge CB, Hrsg. *Kelly's Textbook of Rheumatology*. 6thte Aufl. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 27-38.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2004. Zellverbindungen, Zelladhäsion und die extrazelluläre Matrix. In: Hrsg. *Molekularbiologie der Zelle*. Aufl. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA, 1266-1290.
- Behrens P, Bosch U, Bruns J, Erggelet C, Esenwein SA, Gaissmaier C, Krackhardt T, Löhnert J, Marlovits S, Meenen NM, Mollenhauer JA, Nehrer S, Niethard FU, Nöth U, Perka C, Richter W, Schäfer D, Schneider U, Steinwachs M, Weise K. 2004. Indikations- und Durchführungsempfehlungen der Arbeitsgemeinschaft "Gewebereneration und Gewebeersatz" zur Autologen Chondrozytentransplantation (ACT). *Z Orthop*, 142:529-539.
- Beier F, Lee RJ, Taylor AC, Pestell RG, LuValle P. 1999. Identification of the cyclin D1 gene as a target of activating transcription factor 2 in chondrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (4):1433-1438.
- Bellamy N, Campbell J, Robinson V, Gee T, Bourne R, Wells G. 2006. Viscosupplementation for the treatment of osteoarthritis of the knee. *Cochrane Database Syst Rev*, (2):CD005321.
- Bellino FL. 1992. Estrogen metabolism, not biosynthesis, in rabbit articular cartilage and isolated chondrocytes: a preliminary study. *Steroids*, 57 (10):507-510.
- Benya PD, Shaffer JD. 1982. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*, 30 (1):215-224.
- Benz K, Breit S, Lukoschek M, Mau H, Richter W. 2002. Molecular analysis of expansion, differentiation, and growth factor treatment of human chondrocytes identifies

- differentiation markers and growth-related genes. *Biochem Biophys Res Commun*, 293 (1):284-292.
- Bergstrom WH. 1998. When you see rickets, consider calcium deficiency. *J Pediatr*, 133 (6):722-724.
- Berridge M, Lipp P, Bootman M. 1999. Calcium signalling. *Curr Biol*, 9 (5):R157-159.
- Berthois Y, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. 1986. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83 (8):2496-2500.
- Bingham PJ, Raisz LG. 1974. Bone growth in organ culture: effects of phosphate and other nutrients on bone and cartilage. *Calcif Tissue Res*, 14 (1):31-48.
- Böhm K, Cordes M, Afentakis A, Müller M, Nöthen M, et al. 2006. Gesundheit - Ausgaben, Krankheitskosten und Personal 2004 Wiesbaden: Statistisches Bundesamt - Pressestelle.
- Bond MD, Van Wart HE. 1984. Characterization of the individual collagenases from *Clostridium histolyticum*. *Biochemistry*, 23 (13):3085-3091.
- Bonen DK, Schmid TM. 1991. Elevated extracellular calcium concentrations induce type X collagen synthesis in chondrocyte cultures. *J Cell Biol*, 115 (4):1171-1178.
- Brandt KD, Smith GN, Jr., Simon LS. 2000. Intraarticular injection of hyaluronan as treatment for knee osteoarthritis: what is the evidence? *Arthritis Rheum*, 43 (6):1192-1203.
- Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. 1994. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*, 331 (14):889-895.
- Brown EM, Vassilev PM, Hebert SC. 1995. Calcium ions as extracellular messengers. *Cell*, 83 (5):679-682.
- Buckwalter JA. 2002. Articular cartilage injuries. *Clin Orthop Relat Res*, (402):21-37.
- Buckwalter JA, Mankin HJ. 1997a. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *J Bone Joint Surg Am*, 79:600-611.
- Buckwalter JA, Mankin HJ. 1997b. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *J Bone Joint Surg Am*, 79:612-632.
- Bullough P, Goodfellow J. 1968. The significance of the fine structure of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Br*, 50 (4):852-857.
- Bustin SA. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 25 (2):169-193.
- Cancedda R, Capasso O, Castagnola P, Descalzi-Cancedda F, Quarto N. 1985. Deposition of type X collagen in the cartilage extracellular matrix. *J Cell Biochem*, 28 (1):7-14.

- Carossino AM, Recenti R, Carossino R, Piscitelli E, Mavilia C, Gozzini A, Franchi A, Danielli D, Ciardullo A, Aglietti P, Galli G, Bartaloni J, Pignone AM, Cagnoni M, Brandi ML. Methodological models for "in vitro" amplification and maintenance of human articular chondrocytes from elderly patients.
- Castagnola P, Dozin B, Moro G, Cancedda R. 1988. Changes in the expression of collagen genes show two stages in chondrocyte differentiation in vitro. *J Cell Biol*, 106 (2):461-467.
- Chang W, Tu C, Bajra R, Komuves L, Miller S, Stewler G, Shoback D. 1999a. Calcium sensing in cultured chondrogenic RCJ3.1C5.18 cells. *Endocrinology*, 140 (4):1911-1919.
- Chang W, Tu C, Chen TH, Komuves L, Oda Y, Pratt SA, Miller S, Shoback D. 1999b. Expression and signal transduction of calcium-sensing receptors in cartilage and bone. *Endocrinology*, 140 (12):5883-5893.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162 (1):156-159.
- Clemmensen I, Holund B, Johansen N, Andersen RB. 1982. Demonstration of fibronectin in human articular cartilage by an indirect immunoperoxidase technique. *Histochemistry*, 76 (1):51-56.
- Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SM, Lawler J, Hynes RO, Boivin GP, Bouck N. 1998. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell*, 93 (7):1159-1170.
- Dahl LB, Dahl IM, Engstrom-Laurent A, Granath K. 1985. Concentration and molecular weight of sodium hyaluronate in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other arthropathies. *Ann Rheum Dis*, 44 (12):817-822.
- Deshmukh K, Kline WG, Sawyer BD. 1976. Role of calcium in the phenotypic expression of rabbit articular chondrocytes in culture. *FEBS Lett*, 67 (1):48-51.
- Doege KJ, Sasaki M, Kimura T, Yamada Y. 1991. Complete coding sequence and deduced primary structure of the human cartilage large aggregating proteoglycan, aggrecan. Human-specific repeats, and additional alternatively spliced forms. *J Biol Chem*, 266 (2):894-902.
- Duchene M, Sobel ME, Muller PK. 1982. Levels of collagen mRNA in dedifferentiating chondrocytes. *Exp Cell Res*, 142 (2):317-324.
- Egerbacher M, Helmreich M, Rossmanith W, Haeusler G. 2002. Estrogen receptor-alpha and estrogen receptor-beta are present in the human growth plate in childhood and adolescence, in identical distribution. *Horm Res*, 58 (2):99-103.
- Ehlers EM, Behrens P, Wunsch L, Kuhnelt W, Russlies M. 2001. Effects of hyaluronic acid on the morphology and proliferation of human chondrocytes in primary cell culture. *Ann Anat*, 183 (1):13-17.

- Englund M, Roos EM, Lohmander LS. 2003. Impact of type of meniscal tear on radiographic and symptomatic knee osteoarthritis: a sixteen-year followup of meniscectomy with matched controls. *Arthritis Rheum*, 48 (8):2178-2187.
- Eyre D. 2002. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res*, 4 (1):30-35.
- Eyre DR. 2004. Collagens and cartilage matrix homeostasis. *Clin Orthop Relat Res*, (427 Suppl):S118-122.
- Fan Z, Bau B, Yang H, Soeder S, Aigner T. 2005. Freshly isolated osteoarthritic chondrocytes are catabolically more active than normal chondrocytes, but less responsive to catabolic stimulation with interleukin-1beta. *Arthritis Rheum*, 52 (1):136-143.
- Fichter M, Korner U, Schomburg J, Jennings L, Cole AA, Mollenhauer J. 2006. Collagen degradation products modulate matrix metalloproteinase expression in cultured articular chondrocytes. *J Orthop Res*, 24 (1):63-70.
- Freemont AJ, Hampson V, Tilman R, Goupille P, Taiwo Y, Hoyland JA. 1997. Gene expression of matrix metalloproteinases 1, 3, and 9 by chondrocytes in osteoarthritic human knee articular cartilage is zone and grade specific. *Ann Rheum Dis*, 56 (9):542-549.
- Fritz J, Gaissmaier C, Schewe B, Weise K. 2005. Stellenwert und Technik der Autologen Chondrozyten-Transplantation. *Zentralbl Chir*, 130:327-332.
- Gaissmaier C, Fritz J, Krackhardt T, Flesch I, Aicher WK, Ashammakhi N. 2005. Effect of human platelet supernatant on proliferation and matrix synthesis of human articular chondrocytes in monolayer and three-dimensional alginate cultures. *Biomaterials*, 26 (14):1953-1960.
- Gelber AC, Hochberg MC, Mead LA, Wang NY, Wigley FM, Klag MJ. 2000. Joint injury in young adults and risk for subsequent knee and hip osteoarthritis. *Ann Intern Med*, 133 (5):321-328.
- Giannoni P, Pagano A, Maggi E, Arbico R, Randazzo N, Grandizio M, Cancedda R, Dozin B. 2005. Autologous chondrocyte implantation (ACI) for aged patients: development of the proper cell expansion conditions for possible therapeutic applications. *Osteoarthritis Cartilage*, 13 (7):589-600.
- Gibson UE, Heid CA, Williams PM. 1996. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res*, 6 (10):995-1001.
- Gigout A, Jolicoeur M, Buschmann MD. 2005. Low calcium levels in serum-free media maintain chondrocyte phenotype in monolayer culture and reduce chondrocyte aggregation in suspension culture. *Osteoarthritis Cartilage*, 13 (11):1012-1024.
- Girkontaite I, Frischholz S, Lammi P, Wagner K, Swoboda B, Aigner T, Von der Mark K. 1996. Immunolocalization of type X collagen in normal fetal and adult osteoarthritic cartilage with monoclonal antibodies. *Matrix Biol*, 15 (4):231-238.
- Goldring SR, Goldring MB. 2004. The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res*, (427 Suppl):S27-36.

- Grande DA, Singh IJ, Pugh J. 1987. Healing of experimentally produced lesions in articular cartilage following chondrocyte transplantation. *Anat Rec*, 218 (2):142-148.
- Grigolo B, De Franceschi L, Roseti L, Cattini L, Facchini A. 2005. Down regulation of degenerative cartilage molecules in chondrocytes grown on a hyaluronan-based scaffold. *Biomaterials*, 26 (28):5668-5676.
- Hardingham TE, Fosang AJ. 1992. Proteoglycans: many forms and many functions. *Faseb J*, 6 (3):861-870.
- Havelka S, Horn V, Spohrova D, Valouch P. 1984. The calcified-noncalcified cartilage interface: the tidemark. *Acta Biol Hung*, 35 (2-4):271-279.
- Hayman DM, Blumberg TJ, Scott CC, Athanasiou KA. 2006. The effects of isolation on chondrocyte gene expression. *Tissue Eng*, 12 (9):2573-2581.
- Head DL, Yankeelov JA, Jr. 1976. The effect of calcium chloride on the activity and inhibition of bacterial collagenase. *Int J Pept Protein Res*, 8 (2):155-165.
- Hedlund H, Mengarelli-Widholm S, Reinholt FP, Svensson O. 1993. Stereologic studies on collagen in bovine articular cartilage. *Apmis*, 101 (2):133-140.
- Heinegard D, Lorenzo P, Saxne T. 2001. Matrix Glycoproteins, Proteoglycans, and Cartilage. In: Ruddy S, Harris ED, Jr., Sledge CB, Hrsg. *Kelly's Textbook of Rheumatology*. 6thte Aufl. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 41-50.
- Hidvegi NC, Sales KM, Izadi D, Ong J, Kellam P, Eastwood D, Butler PE. 2006. A low temperature method of isolating normal human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, 14 (1):89-93.
- Homandberg GA, Hui F. 1996. Association of proteoglycan degradation with catabolic cytokine and stromelysin release from cartilage cultured with fibronectin fragments. *Arch Biochem Biophys*, 334 (2):325-331.
- Homandberg GA, Hui F, Wen C, Kuettner KE, Williams JM. 1997. Hyaluronic acid suppresses fibronectin fragment mediated cartilage chondrolysis: I. In vitro. *Osteoarthritis Cartilage*, 5 (5):309-319.
- Huch K, Stöve J, Puhl W, Günther K-P. 2002. Vergleichender Überblick über Verfahren zur Kultivierung artikulärer Chondrozyten. *Z Orthop*, 140:145-152.
- Jakob M, Demarteau O, Schafer D, Stumm M, Heberer M, Martin I. 2003. Enzymatic digestion of adult human articular cartilage yields a small fraction of the total available cells. *Connect Tissue Res*, 44 (3-4):173-180.
- Jennings L, Wu L, King KB, Hammerle H, Cs-Szabo G, Mollenhauer J. 2001. The effects of collagen fragments on the extracellular matrix metabolism of bovine and human chondrocytes. *Connect Tissue Res*, 42 (1):71-86.
- Kang Y, Eger W, Koepp H, Williams JM, Kuettner KE, Homandberg GA. 1999. Hyaluronan suppresses fibronectin fragment-mediated damage to human cartilage explant cultures by enhancing proteoglycan synthesis. *J Orthop Res*, 17 (6):858-869.

- Kaps C, Fuchs S, Endres M, Vetterlein S, Krenn V, Perka C, Sittlinger M. 2004. Molekulare Charakterisierung von gezüchteten humanen dreidimensionalen Chondrozytentransplantaten. *Der Orthopäde*, 33 (1):76-84.
- Kielty CM, Kwan AP, Holmes DF, Schor SL, Grant ME. 1985. Type X collagen, a product of hypertrophic chondrocytes. *Biochem J*, 227 (2):545-554.
- Kirsch T, von der Mark K. 1991. Ca²⁺ binding properties of type X collagen. *FEBS Lett*, 294 (1-2):149-152.
- Kirsch T, Nah HD, Shapiro IM, Pacifici M. 1997. Regulated production of mineralization-competent matrix vesicles in hypertrophic chondrocytes. *J Cell Biol*, 137 (5):1149-1160.
- Knudson CB, Knudson W. 2004. Hyaluronan and CD44: modulators of chondrocyte metabolism. *Clin Orthop Relat Res*, (427 Suppl):S152-162.
- Knudson W, Casey B, Nishida Y, Eger W, Kuettner KE, Knudson CB. 2000. Hyaluronan oligosaccharides perturb cartilage matrix homeostasis and induce chondrocytic chondrolysis. *Arthritis Rheum*, 43 (5):1165-1174.
- Kölbel R. 1974. Schmierungsvorgänge an tierischen Gelenken: Der gegenwärtige Stand der Vorstellungen. *Arch orthop Unfall-Chir*, 78:50-61.
- Koyano Y, Hejna M, Flechtenmacher J, Schmid TM, Thonar EJ, Mollenhauer J. 1996. Collagen and proteoglycan production by bovine fetal and adult chondrocytes under low levels of calcium and zinc ions. *Connect Tissue Res*, 34 (3):213-225.
- Kuettner KE. 1992. Biochemistry of articular cartilage in health and disease. *Clin Biochem*, 25 (3):155-163.
- Kuettner KE, Pauli BU, Gall G, Memoli VA, Schenk RK. 1982. Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes in vitro. I. Isolation, culture characteristics, and morphology. *J Cell Biol*, 93 (3):743-750.
- Lo GH, LaValley M, McAlindon T, Felson DT. 2003. Intra-articular hyaluronic acid in treatment of knee osteoarthritis: a meta-analysis. *Jama*, 290 (23):3115-3121.
- Löffler G. 2001. Binde- und Stützgewebe. In: Hrsg. Basiswissen Biochemie: mit Pathobiochemie. 4., korrigierte Auflage Aufl. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 663-672.
- Lyons TJ, Stoddart RW, McClure SF, McClure J. 2005. The tidemark of the chondro-osseous junction of the normal human knee joint. *J Mol Histol*, 36 (3):207-215.
- Malpeli M, Randazzo N, Cancedda R, Dozin B. 2004. Serum-free growth medium sustains commitment of human articular chondrocyte through maintenance of Sox9 expression. *Tissue Eng*, 10 (1-2):145-155.
- Mankin HJ. 1982. The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am*, 64 (3):460-466.

- Maroudas A. 1986. Physicochemical properties and functional behavior of normal and osteoarthritic human cartilage. In: Kuettner KE, Hrsg. Articular Cartilage Biochemistry. Aufl. New York: Raven Press, 311-330.
- Martin JA, Buckwalter JA. 2003. The role of chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis and in limiting cartilage repair. J Bone Joint Surg Am, 85-A Suppl 2:106-110.
- Martinek V. 2003. Anatomie und Pathophysiologie des hyalinen Knorpels. Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin, 54 (6):166-170.
- Matyas JR, Adams ME, Huang D, Sandell LJ. 1995. Discoordinate gene expression of aggrecan and type II collagen in experimental osteoarthritis. Arthritis Rheum, 38 (3):420-425.
- Messner K, Maletius W. 1996. The long-term prognosis for severe damage to weight-bearing cartilage in the knee: a 14-year clinical and radiographic follow-up in 28 young athletes. Acta Orthop Scand, 67 (2):165-168.
- Miller RR, McDevitt CA. 1988. Thrombospondin is present in articular cartilage and is synthesized by articular chondrocytes. Biochem Biophys Res Commun, 153 (2):708-714.
- Minas T. 2001. Autologous chondrocyte implantation for focal chondral defects of the knee. Clin Orthop Relat Res, (391 Suppl):S349-361.
- Miosge N, Hartmann M, Maelicke C, Herken R. 2004. Expression of collagen type I and type II in consecutive stages of human osteoarthritis. Histochem Cell Biol, 122 (3):229-236.
- Mollenhauer J, Kuettner KE. 1997. Articular Cartilage. In: Dee R, Hurst L, Gruber M, Kottmeier S, Hrsg. Principles of Orthopaedic Practice. 2ndte Aufl. New York: McGraw-Hill, 85-94.
- Mollenhauer J, Aurich M. 2003. Grundlegendes zum Gelenkknorpel. In: Fritz J, Aicher WK, Eichhorn H-J, Hrsg. Praxisleitfaden der Knorpelreparatur. Aufl. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 3-8.
- Mollenhauer J, Burkhardt C, Nisch W, Bossert J, Hempel HJ, Jandt KD, Muehleman. 2008. Definition of the joint cartilage-bone interface by topological scanning technologies: considerations for optimized material interfaces in implant technology. Adv Eng Mat, in press
- Morgelin M, Heinegard D, Engel J, Paulsson M. 1992. Electron microscopy of native cartilage oligomeric matrix protein purified from the Swarm rat chondrosarcoma reveals a five-armed structure. J Biol Chem, 267 (9):6137-6141.
- Nasatzky E, Schwartz Z, Boyan BD, Soskolne WA, Ornoy A. 1993. Sex-dependent effects of 17-beta-estradiol on chondrocyte differentiation in culture. J Cell Physiol, 154 (2):359-367.
- Neuwirth J, Fuhrmann RA, Veit A, Aurich M, Stonans I, Trommer T, Hortschansky P, Chubinskaya S, Mollenhauer JA. 2006. Expression of bioactive bone morphogenetic

- proteins in the subacromial bursa of patients with chronic degeneration of the rotator cuff. *Arthritis Res Ther*, 8 (4):R92.
- Niethard FU, Pfeil J. 2005. Degenerative Gelenkerkrankungen. In: Hrsg. Orthopädie. 5., korrigierte Auflage Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 184-190.
- Otte P. 1991. Basic cell metabolism of articular cartilage. Manometric studies. *Zeitschrift für Rheumatologie*, (50):304-312.
- Peterson L, Brittberg M, Kiviranta I, Akerlund EL, Lindahl A. 2002. Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability. *Am J Sports Med*, 30 (1):2-12.
- Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjogren-Jansson E, Lindahl A. 2000. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop Relat Res*, (374):212-234.
- Pfander D. 2005. Physiologie und Pathophysiologie des Gelenkknorpels. *Akt Rheumatol*, 30:344-353.
- Pfander D, Cramer T, Deuerling D, Weseloh G, Swoboda B. 2000. Expression of thrombospondin-1 and its receptor CD36 in human osteoarthritic cartilage. *Ann Rheum Dis*, 59 (6):448-454.
- Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Lavery S. 2001. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res*, (391 Suppl):S26-33.
- Poole CA. 1993. The Structure and Function of Articular Cartilage Matrices. In: Woessner JF, Howell DS, Hrsg. Joint Cartilage Degradation: basic and clinical aspects. Aufl. New York: Marcel Dekker Inc., 1-35.
- Poole CA, Ayad S, Gilbert RT. 1992. Chondrons from articular cartilage. V. Immunohistochemical evaluation of type VI collagen organisation in isolated chondrons by light, confocal and electron microscopy. *J Cell Sci*, 103 (Pt 4):1101-1110.
- Pullig O. 2003. Zell- und molekularbiologische Grundlagen der humanen Arthrose. *Akt Rheumatol*, 28:308-315.
- Pullig O, Weseloh G, Swoboda B. 1999. Expression of type VI collagen in normal and osteoarthritic human cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*, 7 (2):191-202.
- Pullig O, Weseloh G, Gauer S, Swoboda B. 2000a. Osteopontin is expressed by adult human osteoarthritic chondrocytes: protein and mRNA analysis of normal and osteoarthritic cartilage. *Matrix Biol*, 19 (3):245-255.
- Pullig O, Weseloh G, Ronneberger D, Kakonen S, Swoboda B. 2000b. Chondrocyte differentiation in human osteoarthritis: expression of osteocalcin in normal and osteoarthritic cartilage and bone. *Calcif Tissue Int*, 67 (3):230-240.

- Purple CR, Untermann TG, Pichika R, Homandberg GA. 2002. Fibronectin fragments upregulate insulin-like growth factor binding proteins in chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, 10 (9):734-746.
- Radin EL, Simon SR. 2001. Biomechanics of Joints. In: Ruddy S, Harris ED, Jr., Sledge CB, Hrsg. *Kelly's Textbook of Rheumatology*. 6thte Aufl. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 73-78.
- Rand JA, Ilstrup DM. 1991. Survivorship analysis of total knee arthroplasty. Cumulative rates of survival of 9200 total knee arthroplasties. *J Bone Joint Surg Am*, 73 (3):397-409.
- Rees JA, Ali SY. 1988. Ultrastructural localisation of alkaline phosphatase activity in osteoarthritic human articular cartilage. *Ann Rheum Dis*, 47 (9):747-753.
- Richette P, Corvol M, Bardin T. 2003. Estrogens, cartilage, and osteoarthritis. *Joint Bone Spine*, 70 (4):257-262.
- Richmond RS, Carlson CS, Register TC, Shanker G, Loeser RF. 2000. Functional estrogen receptors in adult articular cartilage: estrogen replacement therapy increases chondrocyte synthesis of proteoglycans and insulin-like growth factor binding protein 2. *Arthritis Rheum*, 43 (9):2081-2090.
- Roos H, Adalberth T, Dahlberg L, Lohmander LS. 1995. Osteoarthritis of the knee after injury to the anterior cruciate ligament or meniscus: the influence of time and age. *Osteoarthritis Cartilage*, 3 (4):261-267.
- Rosenberg K, Olsson H, Morgelin M, Heinegard D. 1998. Cartilage oligomeric matrix protein shows high affinity zinc-dependent interaction with triple helical collagen. *J Biol Chem*, 273 (32):20397-20403.
- Rosner IA, Manni A, Malemud CJ, Boja B, Moskowitz RW. 1982. Estradiol receptors in articular chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 106 (4):1378-1382.
- Roth V, Mow VC. 1980. The intrinsic tensile behavior of the matrix of bovine articular cartilage and its variation with age. *J Bone Joint Surg Am*, 62 (7):1102-1117.
- Sandy JD, Plaas AH. 1989. Studies on the hyaluronate binding properties of newly synthesized proteoglycans purified from articular chondrocyte cultures. *Arch Biochem Biophys*, 271 (2):300-314.
- Sato T, Konomi K, Yamasaki S, Aratani S, Tsuchimochi K, Yokouchi M, Masuko-Hongo K, Yagishita N, Nakamura H, Komiya S, Beppu M, Aoki H, Nishioka K, Nakajima T. 2006. Comparative analysis of gene expression profiles in intact and damaged regions of human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum*, 54 (3):808-817.
- Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G, Fichtel I, Gotzen L, Vecsei V, Schlegel J. 2002. Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis Cartilage*, 10 (1):62-70.
- Schneider U. 2003. Perspektiven des Tissue Engineerings am Gelenkknorpel. *Akt Rheumatol*, 28:322-327.

- Sledge CB, Reddi AH, Walsh DA, Blake DR. 2001. Biology of the Normal Joint. In: Ruddy S, Harris ED, Jr., Sledge CB, Hrsg. Kelly's Textbook of Rheumatology. 6thte Aufl. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1-21.
- Sohn DH, Lottman LM, Lum LY, Kim SG, Pedowitz RA, Coutts RD, Sah RL. 2002. Effect of gravity on localization of chondrocytes implanted in cartilage defects. Clin Orthop Relat Res, (394):254-262.
- Statistisches Bundesamt. 2006. Diagnosedaten der Patienten und Patientinnen in Krankenhäuser (einschl. Sterbe- und Stundenfälle) 2004 Wiesbaden: Statistisches Bundesamt.
- Tallheden T, Bengtsson C, Brantsing C, Sjogren-Jansson E, Carlsson L, Peterson L, Brittberg M, Lindahl A. 2005. Proliferation and differentiation potential of chondrocytes from osteoarthritic patients. Arthritis Res Ther, 7 (3):R560-568.
- Talwar RM, Wong BS, Svoboda K, Harper RP. 2006. Effects of estrogen on chondrocyte proliferation and collagen synthesis in skeletally mature articular cartilage. J Oral Maxillofac Surg, 64 (4):600-609.
- Tanaka M, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K, Nakamura H. 2006. Suppressive effects of hyaluronan on MMP-1 and RANTES production from chondrocytes. Rheumatol Int, 26 (3):185-190.
- Tetlow LC, Adlam DJ, Woolley DE. 2001. Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. Arthritis Rheum, 44 (3):585-594.
- Urban JP. 1994. The chondrocyte: a cell under pressure. Br J Rheumatol, 33 (10):901-908.
- Ushiyama T, Ueyama H, Inoue K, Ohkubo I, Hukuda S. 1999. Expression of genes for estrogen receptors alpha and beta in human articular chondrocytes. Osteoarthritis Cartilage, 7 (6):560-566.
- van den Berg WB, van der Kraan PM, Scharstuhl A, van Beuningen HM. 2001. Growth factors and cartilage repair. Clin Orthop Relat Res, (391 Suppl):S244-250.
- Van der Rest M, Rosenberg LC, Olsen BR, Poole AR. 1986. Chondrocalcin is identical with the C-propeptide of type II procollagen. Biochem J, 237 (3):923-925.
- Voigt C, Neumann S, Brodhun A, Mollenhauer JA, Pullig O. 2008. Hyaluronic acid stabilizes the chondrocytic phenotype during cell isolation from osteoarthritic human joint cartilage. Osteoarthritis Cartilage, submitted
- von der Mark K, Kirsch T, Nerlich A, Kuss A, Weseloh G, Gluckert K, Stoss H. 1992. Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. Indication of chondrocyte hypertrophy. Arthritis Rheum, 35 (7):806-811.
- Wang D, Canaff L, Davidson D, Corluka A, Liu H, Hendy GN, Henderson JE. 2001. Alterations in the sensing and transport of phosphate and calcium by differentiating chondrocytes. J Biol Chem, 276 (36):33995-34005.

- Welshons WV, Wolf MF, Murphy CS, Jordan VC. 1988. Estrogenic activity of phenol red. *Mol Cell Endocrinol*, 57 (3):169-178.
- Wildner M, Sangha O, Behrend C. 2000. Wirtschaftlichkeitsuntersuchung zur Autologen Chondrozytentransplantation (ACT). *Arthroskopie*, 13:123-131.
- Wilhelm SM, Shao ZH, Housley TJ, Seperack PK, Baumann AP, Gunja-Smith Z, Woessner JF, Jr. 1993. Matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1). Identification as the cartilage acid metalloprotease and effect of pH on catalytic properties and calcium affinity. *J Biol Chem*, 268 (29):21906-21913.
- Woessner JF, Jr. 1991. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *Faseb J*, 5 (8):2145-2154.
- Yuan GH, Masuko-Hongo K, Sakata M, Tsuruha J, Onuma H, Nakamura H, Aoki H, Kato T, Nishioka K. 2001. The role of C-C chemokines and their receptors in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 44 (5):1056-1070.

11 Anhang

11.1 Verzeichnis der Datentabellen

Anhang 1: Datentabelle zur Beschreibung des Ausgangsmaterials (Nullpunkte)	B
Anhang 2: Vergleich Nullpunkte mit Standardverdau, absolute Expression ausgewählter Gene, Aktivität der AP und Zellzahl / g verdauter Knorpel	C
Anhang 3: Vergleich Nullpunkte mit Standardverdau, Genexpressionen normalisiert auf GAPDH und Kollagen Typ II	D
Anhang 4: Vergleich Verdau in Ca^{2+} -haltigem und Ca^{2+} -freiem Medium sowie Nullpunkte, absolute Genexpression, Aktivität der AP und Zellzahl / g verdauter Knorpel.....	E
Anhang 5: Vergleich von Verdau in Ca^{2+} -haltigem und Ca^{2+} -freiem Medium sowie Nullpunkte, Genexpressionen normalisiert auf GAPDH und Kollagen Typ II	E
Anhang 6: Verdau in phenolrothaltigem und phenolrotfreiem Medium sowie Nullpunkte, absolute Genexpression, Aktivität der AP und Zellzahl / g verdauter Knorpel.....	F
Anhang 7: Vergleich von Verdau in phenolrothaltigem und phenolrotfreiem Medium sowie Nullpunkte, Genexpressionen normalisiert auf GAPDH und Kollagen Typ II	F
Anhang 8: Vergleich von Verdau in Standard vs. HA-haltigem Medium sowie Nullpunkte, absolute Genexpression, Aktivität der AP und Zellzahl / g verdauter Knorpel.....	G
Anhang 9: Vergleich von Verdau in Standardmedium und HA-haltigem Medium sowie Nullpunkte, Genexpressionen normalisiert auf GAPDH und Kollagen Typ II	G
Anhang 10: Vergleich Standardverdau vs. Verdau in Minimalmedium sowie entsprechende Nullpunkte, absolute Genexpression, Aktivität der AP, Zellzahl / g verdauter Knorpel, Genexpression normalisiert auf GAPDH und Kollagen Typ II	H
Anhang 11: Bestandteile ausgewählter Zellkulturmedien	I

Anhang 1: Datentabelle zur Beschreibung des Ausgangsmaterials (Nullpunkte), n = 29, *starting quantity* (SQ) äquivalent zu 47,5 ng Gesamt-RNA, Genepression normalisiert auf Expression von GAPDH und Kollagen Typ II

Probe	SQ GAPDH	SQ Kollagen I	SQ Kollagen II	SQ Kollagen X	SQ MMP-3	Kollagen 1 / GAPDH	Kollagen 2 / GAPDH	Kollagen 10 / GAPDH	MMP-3 / GAPDH	Kollagen 1 / Kollagen 2	Kollagen 10 / Kollagen 2
NP 1	967.000	0	2.710.000	3.910	7.545	0,000E+00	2,802E+00	4,043E-03	7,802E-03	0,000E+00	1,443E-03
NP 2	2.290.000	589	515.500	16.650	4.525.000	2,570E-04	2,251E-01	7,271E-03	1,976E+00	1,142E-03	3,230E-02
NP 3	8.250.000	202.450	15.250.000	214.500	121.000	2,454E-02	1,848E+00	2,600E-02	1,467E-02	1,328E-02	1,407E-02
NP 4	250.000	3.225	667.000	2.210	301	1,290E-02	2,668E+00	8,840E-03	1,204E-03	4,835E-03	3,313E-03
NP 5	39.250	443	6.550.000	310	840	1,127E-02	1,669E+02	7,898E-03	2,140E-02	6,756E-05	4,733E-05
NP 6	73.700	16.600	28.250.000	0	36.650	2,252E-01	3,833E+02	0,000E+00	4,973E-01	5,876E-04	0,000E+00
NP 7	20.950	0	1.195.000	48	164.000	0,000E+00	5,704E+01	2,308E-03	7,828E+00	0,000E+00	4,046E-05
NP 8	23.250	0	147.000	68	72.450	0,000E+00	6,323E+00	2,942E-03	3,116E+00	0,000E+00	4,653E-04
NP 9	127.500	943	2.310.000	200	39.600	7,392E-03	1,812E+01	1,569E-03	3,106E-01	4,080E-04	8,658E-05
NP 10	28.450	385	483.000	41	5.045	1,351E-02	1,698E+01	1,457E-03	1,773E-01	7,961E-04	8,582E-05
NP 11	52.800	1.151	582.500	1.315	1.100	2,179E-02	1,103E+01	2,491E-02	2,083E-02	1,975E-03	2,258E-03
NP 12	12.710	0	490.500	78	7.460	0,000E+00	3,859E+01	6,161E-03	5,869E-01	0,000E+00	1,596E-04
NP 13	34.100	0	875.000	339	40.550	0,000E+00	2,566E+01	9,941E-03	1,189E+00	0,000E+00	3,874E-04
NP 14	55.100	1.234	708.500	2.605	7.815	2,240E-02	1,286E+01	4,728E-02	1,418E-01	1,742E-03	3,677E-03
NP 15	187.500	0	5.390.000	362	172.000	0,000E+00	2,875E+01	1,928E-03	9,173E-01	0,000E+00	6,707E-05
NP 16	120.000	282	1.825.000	7.085	707.000	2,346E-03	1,521E+01	5,904E-02	5,892E+00	1,542E-04	3,882E-03
NP 17	151.000	13.800	2.850.000	12.500	10.450	9,139E-02	1,887E+01	8,278E-02	6,921E-02	4,842E-03	4,386E-03
NP 18	43.900	1.437	1.060.000	2.475	3.000	3,272E-02	2,415E+01	5,638E-02	6,834E-02	1,355E-03	2,335E-03
NP 19	94.950	212	1.755.000	3.825	14.950	2,227E-03	1,848E+01	4,028E-02	1,575E-01	1,205E-04	2,179E-03
NP 20	103.300	1.828	125.000	0	418.000	1,770E-02	1,210E+00	0,000E+00	4,046E+00	1,462E-02	0,000E+00
NP 21	152.000	13.345	4.275.000	14.965	123.500	8,780E-02	2,813E+01	9,845E-02	8,125E-01	3,122E-03	3,501E-03
NP 22	91.400	226	3.590.000	1.090	40.400	2,473E-03	3,928E+01	1,193E-02	4,420E-01	6,295E-05	3,036E-04
NP 23	339.000	7.945	6.995.000	6.810	28.000	2,344E-02	2,063E+01	2,009E-02	8,260E-02	1,136E-03	9,736E-04
NP 24	407.500	21.450	6.900.000	15.700	76.050	5,264E-02	1,693E+01	3,853E-02	1,866E-01	3,109E-03	2,275E-03
NP 25	575.500	15.800	23.200.000	6.260	32.400	2,745E-02	4,031E+01	1,088E-02	5,630E-02	6,810E-04	2,698E-04
NP 26	417.500	499.000	867.500	29.250	98.900	1,195E+00	2,078E+00	7,006E-02	2,369E-01	5,752E-01	3,372E-02
NP 27	201.500	6.875	1.655.000	4.810	40.750	3,412E-02	8,213E+00	2,387E-02	2,022E-01	4,154E-03	2,906E-03
NP 28	425.500	14.085	3.815.000	6.125	154.000	3,310E-02	8,966E+00	1,439E-02	3,619E-01	3,692E-03	1,606E-03
NP 29	273.000	23.800	3.060.000	0	25.650	8,718E-02	1,121E+01	0,000E+00	9,396E-02	7,778E-03	0,000E+00

Anhang 2: Vergleich Nullpunkte (NP) mit Standardverdau (V), SQ-Werte äquivalent zu 47,5 ng Gesamt-RNA, Aktivität der AP und Zellzahl / g verdauter Knorpel

Probe		SQ GAPDH	SQ Kollagen I	SQ Kollagen II	SQ Kollagen X	SQ MMP-3	µunits AP / 100.000 Zellen	Zellzahl pro g Knorpel
S1	NP	2.290.000	589	515.500	16.650	4.525.000	-	-
	V	25.500.000	1.342.000	17.400.000	342.500	220.500.000	0,00	4.880.000
S2	NP	8.250.000	202.450	15.250.000	214.500	121.000	-	-
	V	8.270.000	12.795	32.500.000	351.500	20.150.000	16,06	5.340.000
S3	NP	250.000	3.225	667.000	2.210	301	-	-
	V	784.500	1.385.000	81.050.000	64.500	70.750.000	199,58	4.540.000
S4	NP	39.250	443	6.550.000	310	840	-	-
	V	396.500	325.000	37.550.000	28.450	17.050.000	33,68	7.550.000
S5	NP	73.700	16.600	28.250.000	0	36.650	-	-
	V	97.050	29.000	8.960.000	14.550	8.725.000	27,05	7.060.000
S6	NP	20.950	0	1.195.000	48	164.000	-	-
	V	1.320.000	19.000	4.070.000	25.250	145.000.000	0,00	4.490.000
S7	NP	23.250	0	147.000	68	72.450	-	-
	V	276.000	432	3.775.000	3.140	34.250.000	0,00	3.190.000
S8	NP	127.500	943	2.310.000	200	39.600	-	-
	V	161.500	4.720	1.021.000	21.850	9.380.000	124,68	5.490.000
S9	NP	28.450	385	483.000	41	5.045	-	-
	V	432.000	72.750	5.695.000	28.200	20.500.000	5,87	4.540.000
S10	NP	52.800	1.151	582.500	1.315	1.100	-	-
	V	678.000	94.350	8.145.000	161.000	11.850.000	127,28	5.320.000
S11	NP	12.710	0	490.500	78	7.460	-	-
	V	522.500	125.000	12.800.000	69.450	40.350.000	39,99	4.290.000
S12	NP	34.100	0	875.000	339	40.550	-	-
	V	917.500	2.240	14.100.000	14.650	20.800.000	0,00	560.000
S13	NP	103.300	1.828	125.000	0	418.000	-	-
	V	3.250.000	115.000	9.145.000	145.000	70.700.000	0,00	3.560.000
S14	NP	152.000	13.345	4.275.000	14.965	123.500	-	-
	V	2.080.000	844.500	28.800.000	400.500	37.850.000	127,48	2.980.000
S15	NP	91.400	226	3.590.000	1.090	40.400	-	-
	V	1.660.000	45.600	7.100.000	77.600	10.950.000	0,13	5.190.000
S16	NP	339.000	7.945	6.995.000	6.810	28.000	-	-
	V	3.550.000	99.300	29.400.000	477.000	25.150.000	2,61	3.610.000
S17	NP	407.500	21.450	6.900.000	15.700	76.050	-	-
	V	2.090.000	319.500	28.150.000	728.500	22.500.000	4,91	2.315.000
S18	NP	575.500	15.800	23.200.000	6.260	32.400	-	-
	V	1.940.000	275.500	33.550.000	232.500	7.770.000	34,14	4.970.000
S19	NP	417.500	499.000	867.500	29.250	98.900	-	-
	V	1.080.000	108.450	6.465.000	71.000	15.400.000	17,13	3.130.000
S20	NP	201.500	6.875	1.655.000	4.810	40.750	-	-
	V	1.425.000	108.500	12.950.000	105.400	13.000.000	71,34	1.770.000
S21	NP	425.500	14.085	3.815.000	6.125	154.000	-	-
	V	2.940.000	856.000	19.550.000	94.200	41.350.000	111,96	3.610.000

Anhang 3: Vergleich Nullpunkte (NP) mit Standardverdau (V), Genexpressionen normalisiert auf GAPDH und Kollagen Typ II

Probe		Kollagen 1 / GAPDH	Kollagen 2 / GAPDH	Kollagen 10 / GAPDH	MMP-3 / GAPDH	Kollagen 1 / Kollagen 2	Kollagen 10 / Kollagen 2
S1	NP	2,570E-04	2,251E-01	7,271E-03	1,976E+00	1,142E-03	3,230E-02
	V	5,263E-02	6,824E-01	1,343E-02	8,647E+00	7,713E-02	1,968E-02
S2	NP	2,454E-02	1,848E+00	2,600E-02	1,467E-02	1,328E-02	1,407E-02
	V	1,547E-03	3,930E+00	4,250E-02	2,437E+00	3,937E-04	1,082E-02
S3	NP	1,290E-02	2,668E+00	8,840E-03	1,204E-03	4,835E-03	3,313E-03
	V	1,765E+00	1,033E+02	8,222E-02	9,018E+01	1,709E-02	7,958E-04
S4	NP	1,127E-02	1,669E+02	7,898E-03	2,140E-02	6,756E-05	4,733E-05
	V	8,197E-01	9,470E+01	7,175E-02	4,300E+01	8,655E-03	7,577E-04
S5	NP	2,252E-01	3,833E+02	0,000E+00	4,973E-01	5,876E-04	0,000E+00
	V	2,988E-01	9,232E+01	1,499E-01	8,990E+01	3,237E-03	1,624E-03
S6	NP	0,000E+00	5,704E+01	2,308E-03	7,828E+00	0,000E+00	4,046E-05
	V	1,439E-02	3,083E+00	1,913E-02	1,098E+02	4,668E-03	6,204E-03
S7	NP	0,000E+00	6,323E+00	2,942E-03	3,116E+00	0,000E+00	4,653E-04
	V	1,563E-03	1,368E+01	1,138E-02	1,241E+02	1,143E-04	8,318E-04
S8	NP	7,392E-03	1,812E+01	1,569E-03	3,106E-01	4,080E-04	8,658E-05
	V	2,923E-02	6,322E+00	1,353E-01	5,808E+01	4,623E-03	2,140E-02
S9	NP	1,351E-02	1,698E+01	1,457E-03	1,773E-01	7,961E-04	8,582E-05
	V	1,684E-01	1,318E+01	6,528E-02	4,745E+01	1,277E-02	4,952E-03
S10	NP	2,179E-02	1,103E+01	2,491E-02	2,083E-02	1,975E-03	2,258E-03
	V	1,392E-01	1,201E+01	2,375E-01	1,748E+01	1,158E-02	1,977E-02
S11	NP	0,000E+00	3,859E+01	6,161E-03	5,869E-01	0,000E+00	1,596E-04
	V	2,392E-01	2,450E+01	1,329E-01	7,722E+01	9,766E-03	5,426E-03
S12	NP	0,000E+00	2,566E+01	9,941E-03	1,189E+00	0,000E+00	3,874E-04
	V	2,441E-03	1,537E+01	1,597E-02	2,267E+01	1,589E-04	1,039E-03
S13	NP	1,770E-02	1,210E+00	0,000E+00	4,046E+00	1,462E-02	0,000E+00
	V	3,538E-02	2,814E+00	4,462E-02	2,175E+01	1,258E-02	1,586E-02
S14	NP	8,780E-02	2,813E+01	9,845E-02	8,125E-01	3,122E-03	3,501E-03
	V	4,060E-01	1,385E+01	1,925E-01	1,820E+01	2,932E-02	1,391E-02
S15	NP	2,473E-03	3,928E+01	1,193E-02	4,420E-01	6,295E-05	3,036E-04
	V	2,747E-02	4,277E+00	4,675E-02	6,596E+00	6,423E-03	1,093E-02
S16	NP	2,344E-02	2,063E+01	2,009E-02	8,260E-02	1,136E-03	9,736E-04
	V	2,797E-02	8,282E+00	1,344E-01	7,085E+00	3,378E-03	1,622E-02
S17	NP	5,264E-02	1,693E+01	3,853E-02	1,866E-01	3,109E-03	2,275E-03
	V	1,529E-01	1,347E+01	3,486E-01	1,077E+01	1,135E-02	2,588E-02
S18	NP	2,745E-02	4,031E+01	1,088E-02	5,630E-02	6,810E-04	2,698E-04
	V	1,420E-01	1,729E+01	1,198E-01	4,005E+00	8,212E-03	6,930E-03
S19	NP	1,195E+00	2,078E+00	7,006E-02	2,369E-01	5,752E-01	3,372E-02
	V	1,004E-01	5,986E+00	6,574E-02	1,426E+01	1,677E-02	1,098E-02
S20	NP	3,412E-02	8,213E+00	2,387E-02	2,022E-01	4,154E-03	2,906E-03
	V	7,614E-02	9,088E+00	7,396E-02	9,123E+00	8,378E-03	8,139E-03
S21	NP	3,310E-02	8,966E+00	1,439E-02	3,619E-01	3,692E-03	1,606E-03
	V	2,912E-01	6,650E+00	3,204E-02	1,406E+01	4,379E-02	4,818E-03

Anhang 4: Daten zu Verdau in Ca^{2+} -haltigem (Ca^{++}) und Ca^{2+} -freiem Medium (Ca^{--}) sowie dazugehörige Nullpunkte (NP), SQ-Werte äquivalent zu 47,5 ng Gesamt-RNA, Aktivität der AP und Zellzahl / g verdauter Knorpel

Probe		SQ GAPDH	SQ Kollagen I	SQ Kollagen II	SQ Kollagen X	SQ MMP-3	µunits AP / 100.000 Zellen	Zellzahl pro g Knorpel
Ca 1	NP	0	0	2.930.000	0	6.425	-	-
	Ca ⁺⁺	479.000	10.405	11.850.000	13.350	122.500.000	82,44	5.330.000
	Ca ⁻	610.000	105.000	9.415.000	38.400	60.250.000	107,99	3.660.000
Ca 2	NP	139.550	127	1.460.000	0	6.565	-	-
	Ca ⁺⁺	2.935.000	892.500	7.440.000	65.250	52.500.000	13,89	3.140.000
	Ca ⁻	6.215.000	2.390.000	23.000.000	85.150	102.900.000	57,88	3.510.000
Ca 3	NP	86.900	0	364.000	0	2.460	-	-
	Ca ⁺⁺	1.235.000	7.920	2.795.000	54.950	19.175.000	5,71	3.320.000
	Ca ⁻	2.725.000	103.050	5.800.000	149.500	24.500.000	13,46	3.770.000
Ca 4	NP	74.950	0	2.290.000	0	28.600	-	-
	Ca ⁺⁺	4.845.000	2.610.000	27.300.000	20.650	348.000.000	39,12	4.600.000
	Ca ⁻	7.770.000	1.865.000	21.700.000	23.650	226.000.000	34,30	5.740.000
Ca 5	NP	388.500	0	879.500	3.040	24.300	-	-
	Ca ⁺⁺	392.500	21	6.540.000	15.350	3.210.000	66,91	4.868.000
	Ca ⁻	13.050.000	179.500	22.700.000	213.500	48.400.000	25,29	4.289.000

Anhang 5: Vergleich von Verdau in Ca^{2+} -haltigem (Ca^{++}) und Ca^{2+} -freiem (Ca^{--}) Medium sowie entsprechende Nullpunkte (NP), Genexpressionen normalisiert auf GAPDH und Kollagen Typ II

Probe	Kollagen 1 / GAPDH	Kollagen 2 / GAPDH	Kollagen 10 / GAPDH	MMP-3 / GAPDH	Kollagen 1 / Kollagen 2	Kollagen 10 / Kollagen 2
Ca 1	NP	-	-	-	-	-
	Ca"+"	2,172E-02	2,474E+01	2,787E-02	2,557E+02	8,781E-04
	Ca"-"	1,721E-01	1,543E+01	6,295E-02	9,877E+01	1,115E-02
Ca 2	NP	9,101E-04	1,046E+01	0,000E+00	4,704E-02	8,699E-05
	Ca"+"	3,041E-01	2,535E+00	2,223E-02	1,789E+01	1,200E-01
	Ca"-"	3,846E-01	3,701E+00	1,370E-02	1,656E+01	1,039E-01
Ca 3	NP	0,000E+00	4,189E+00	0,000E+00	2,831E-02	0,000E+00
	Ca"+"	6,413E-03	2,263E+00	4,449E-02	1,553E+01	2,834E-03
	Ca"-"	3,782E-02	2,128E+00	5,486E-02	8,991E+00	1,777E-02
Ca 4	NP	0,000E+00	3,055E+01	0,000E+00	3,816E-01	0,000E+00
	Ca"+"	5,387E-01	5,635E+00	4,262E-03	7,183E+01	9,560E-02
	Ca"-"	2,400E-01	2,793E+00	3,044E-03	2,909E+01	8,594E-02
Ca 5	NP	0,000E+00	2,264E+00	7,825E-03	6,255E-02	0,000E+00
	Ca"+"	5,248E-05	1,666E+01	3,911E-02	8,178E+00	3,150E-06
	Ca"-"	1,375E-02	1,739E+00	1,636E-02	3,709E+00	7,907E-03

Anhang 6: Verdau in phenolrothaltigem (P''+') und phenolrotfreiem Medium (P''-') sowie Nullpunkte (NP), SQ-Werte äquivalent zu 47,5 ng Gesamt-RNA, Aktivität der AP und Zellzahl / g verdauter Knorpel

Probe	SQ GAPDH	SQ Kollagen I	SQ Kollagen II	SQ Kollagen X	SQ MMP-3	µunits AP / 100.000 Zellen	Zellzahl pro g Knorpel
P1	NP	2.290.000	589	515.500	16.650	4.525.000	-
	P''+''	25.500.000	1.342.000	17.400.000	342.500	220.500.000	0,00
	P''-''	23.000.000	1.515.000	5.565.000	142.000	392.000.000	0,00
P2	NP	8.250.000	202.450	15.250.000	214.500	121.000	-
	P''+''	8.270.000	12.795	32.500.000	351.500	20.150.000	16,06
	P''-''	95.400	3.420	26.550.000	2.265	19.800.000	60,62
P3	NP	23.250	0	147.000	68	72.450	-
	P''+''	276.000	432	3.775.000	3.140	34.250.000	0,00
	P''-''	447.500	1.720	3.055.000	11.545	39.150.000	0,00
P4	NP	91.400	226	3.590.000	1.090	40.400	-
	P''+''	1.660.000	45.600	7.100.000	77.600	10.950.000	0,13
	P''-''	1.505.000	396.000	21.300.000	192.500	25.000.000	3,00
P5	NP	339.000	7.945	6.995.000	6.810	28.000	-
	P''+''	3.550.000	99.300	29.400.000	477.000	25.150.000	2,61
	P''-''	2.255.000	192.000	30.200.000	790.000	27.950.000	46,38
P6	NP	201.500	6.875	1.655.000	4.810	40.750	-
	P''+''	1.425.000	108.500	12.950.000	105.400	13.000.000	71,34
	P''-''	3.135.000	505.000	29.950.000	506.000	27.550.000	71,01
P7	NP	425.500	14.085	3.815.000	6.125	154.000	-
	P''+''	2.940.000	856.000	19.550.000	94.200	41.350.000	111,96
	P''-''	3.020.000	2.145.000	29.950.000	266.500	48.200.000	95,08

Anhang 7: Vergleich von Verdau in phenolrothaltigem (P''+') und phenolrotfreiem (P''-') Medium sowie Nullpunkte (NP), Genexpressionen normalisiert auf GAPDH und Kollagen Typ II

Probe	Kollagen 1 / GAPDH	Kollagen 2 / GAPDH	Kollagen 10 / GAPDH	MMP-3 / GAPDH	Kollagen 1 / Kollagen 2	Kollagen 10 / Kollagen 2
P1	NP	2,570E-04	2,251E-01	7,271E-03	1,976E+00	1,142E-03
	P''+''	5,263E-02	6,824E-01	1,343E-02	8,647E+00	7,713E-02
	P''-''	6,587E-02	2,420E-01	6,174E-03	1,704E+01	2,722E-01
P2	NP	2,454E-02	1,848E+00	2,600E-02	1,467E-02	1,328E-02
	P''+''	1,547E-03	3,930E+00	4,250E-02	2,437E+00	3,937E-04
	P''-''	3,585E-02	2,783E+02	2,374E-02	2,075E+02	1,288E-04
P3	NP	0,000E+00	6,323E+00	2,942E-03	3,116E+00	0,000E+00
	P''+''	1,563E-03	1,368E+01	1,138E-02	1,241E+02	1,143E-04
	P''-''	3,844E-03	6,827E+00	2,580E-02	8,749E+01	5,630E-04
P4	NP	2,473E-03	3,928E+01	1,193E-02	4,420E-01	6,295E-05
	P''+''	2,747E-02	4,277E+00	4,675E-02	6,596E+00	6,423E-03
	P''-''	2,631E-01	1,415E+01	1,279E-01	1,661E+01	1,859E-02
P5	NP	2,344E-02	2,063E+01	2,009E-02	8,260E-02	1,136E-03
	P''+''	2,797E-02	8,282E+00	1,344E-01	7,085E+00	3,378E-03
	P''-''	8,514E-02	1,339E+01	3,503E-01	1,239E+01	6,358E-03
P6	NP	3,412E-02	8,213E+00	2,387E-02	2,022E-01	4,154E-03
	P''+''	7,614E-02	9,088E+00	7,396E-02	9,123E+00	8,378E-03
	P''-''	1,611E-01	9,553E+00	1,614E-01	8,788E+00	1,686E-02
P7	NP	3,310E-02	8,966E+00	1,439E-02	3,619E-01	3,692E-03
	P''+''	2,912E-01	6,650E+00	3,204E-02	1,406E+01	4,379E-02
	P''-''	7,103E-01	9,917E+00	8,825E-02	1,596E+01	7,162E-02

Anhang 8: Daten zum Verdau in Standard (DMEM) vs. Hyaluronsäurehaltigem Medium (HA "+") sowie entsprechende Nullpunkte (NP), SQ-Werte äquivalent zu 47,5 ng Gesamt-RNA, Aktivität der AP und Zellzahl / g verdauter Knorpel

Probe	SQ GAPDH	SQ Kollagen I	SQ Kollagen II	SQ Kollagen X	SQ MMP-3	µunits AP / 100.000 Zellen	Zellzahl pro g Knorpel
HA1	NP	210.500	262	2.080.000	2.205	745	-
	DMEM	6.215.000	68.100	41.200.000	293.500	12.550.000	0,00
	HA "+"	6.720.000	680.000	68.300.000	441.000	6.250.000	0,00
HA2	NP	250.000	3.225	667.000	2.210	301	-
	DMEM	784.500	1.385.000	81.050.000	64.500	70.750.000	199,58
	HA "+"	521.000	838.500	60.050.000	49.200	31.950.000	339,43
HA3	NP	39.250	443	6.550.000	310	840	-
	DMEM	396.500	325.000	37.550.000	28.450	17.050.000	33,68
	HA "+"	178.500	260.000	10.450.000	29.150	3.840.000	83,47
HA4	NP	407.500	21.450	6.900.000	15.700	76.050	-
	DMEM	2.090.000	319.500	28.150.000	728.500	22.500.000	4,91
	HA "+"	2.615.000	263.000	37.300.000	1.290.000	33.950.000	10,66
HA5	NP	575.500	15.800	23.200.000	6.260	32.400	-
	DMEM	1.940.000	275.500	33.550.000	232.500	7.770.000	34,14
	HA "+"	888.500	97.750	27.150.000	157.000	5.400.000	20,51
HA6	NP	417.500	499.000	867.500	29.250	98.900	-
	DMEM	1.080.000	108.450	6.465.000	71.000	15.400.000	17,13
	HA "+"	952.000	173.000	7.140.000	60.050	15.450.000	5,12

Anhang 9: Vergleich von Verdau in Standardmedium (DMEM) und Hyaluronsäurehaltigem (HA "+") Medium sowie Nullpunkte (NP), Genexpressionen normalisiert auf GAPDH und Kollagen Typ II

Probe	Kollagen 1 / GAPDH	Kollagen 2 / GAPDH	Kollagen 10 / GAPDH	MMP-3 / GAPDH	Kollagen 1 / Kollagen 2	Kollagen 10 / Kollagen 2
HA1	NP	1,245E-03	9,881E+00	1,048E-02	3,539E-03	1,260E-04
	DMEM	1,096E-02	6,629E+00	4,722E-02	2,019E+00	1,653E-03
	HA "+"	1,012E-01	1,016E+01	6,563E-02	9,301E-01	9,956E-03
HA2	NP	1,290E-02	2,668E+00	8,840E-03	1,204E-03	4,835E-03
	DMEM	1,765E+00	1,033E+02	8,222E-02	9,018E+01	1,709E-02
	HA "+"	1,609E+00	1,153E+02	9,443E-02	6,132E+01	1,396E-02
HA3	NP	1,127E-02	1,669E+02	7,898E-03	2,140E-02	6,756E-05
	DMEM	8,197E-01	9,470E+01	7,175E-02	4,300E+01	8,655E-03
	HA "+"	1,457E+00	5,854E+01	1,633E-01	2,151E+01	2,488E-02
HA4	NP	5,264E-02	1,693E+01	3,853E-02	1,866E-01	3,109E-03
	DMEM	1,529E-01	1,347E+01	3,486E-01	1,077E+01	1,135E-02
	HA "+"	1,006E-01	1,426E+01	4,933E-01	1,298E+01	7,051E-03
HA5	NP	2,745E-02	4,031E+01	1,088E-02	5,630E-02	6,810E-04
	DMEM	1,420E-01	1,729E+01	1,198E-01	4,005E+00	8,212E-03
	HA "+"	1,100E-01	3,056E+01	1,767E-01	6,078E+00	3,600E-03
HA6	NP	1,195E+00	2,078E+00	7,006E-02	2,369E-01	5,752E-01
	DMEM	1,004E-01	5,986E+00	6,574E-02	1,426E+01	1,677E-02
	HA "+"	1,817E-01	7,500E+00	6,308E-02	1,623E+01	2,423E-02

Anhang 10: Vergleich Standardverdau (DMEM) vs. Verdau in Minimalmedium (Mini) sowie entsprechende Nullpunkte (NP), SQ-Werte äquivalent zu 47,5ng Gesamt-RNA, Aktivität der AP, Zellzahl / g verdauter Knorpel und Genexpressionsverhältnisse normalisiert auf GAPDH und Kollagen Typ II

	Probe	SQ GAPDH	SQ Kollagen I	SQ Kollagen II	SQ Kollagen X	SQ MMP-3	µunits AP / 100.000 Z	Zellzahl pro g Knorpel	Kollagen 1 / GAPDH	Kollagen 2 / GAPDH	Kollagen 10 / GAPDH	MMP-3 / GAPDH	Kollagen 1 / Kollagen 2	Kollagen 10 / Kollagen 2
M1	NP	73.700	16.600	28.250.000	0	36.650	-	-	2,252E-01	3,833E+02	0,000E+00	4,973E-01	5,876E-04	0,000E+00
	DMEM	97.050	29.000	8.960.000	14.550	8.725.000	27,05	7.060.000	2,988E-01	9,232E+01	1,499E-01	8,990E+01	3,237E-03	1,624E-03
	Mini	109.650	5.125	6.680.000	13.750	9.140.000	47,65	4.170.000	4,674E-02	6,092E+01	1,254E-01	8,336E+01	7,672E-04	2,058E-03
M2	NP	28.450	385	483.000	41	5.045	-	-	1,351E-02	1,698E+01	1,457E-03	1,773E-01	7,961E-04	8,582E-05
	DMEM	432.000	72.750	5.695.000	28.200	20.500.000	5,87	4.540.000	1,684E-01	1,318E+01	6,528E-02	4,745E+01	1,277E-02	4,952E-03
	Mini	181.500	2.065	1.385.000	6.730	19.950.000	0,00	3.730.000	1,138E-02	7,631E+00	3,708E-02	1,099E+02	1,491E-03	4,859E-03
M3	NP	52.800	1.151	582.500	1.315	1.100	-	-	2,179E-02	1,103E+01	2,491E-02	2,083E-02	1,975E-03	2,258E-03
	DMEM	678.000	94.350	8.145.000	161.000	11.850.000	127,28	5.320.000	1,392E-01	1,201E+01	2,375E-01	1,748E+01	1,158E-02	1,977E-02
	Mini	167.000	3.285	944.500	24.750	10.600.000	30,29	4.070.000	1,967E-02	5,656E+00	1,482E-01	6,347E+01	3,478E-03	2,620E-02
M4	NP	12.710	0	490.500	78	7.460	-	-	0,000E+00	3,859E+01	6,161E-03	5,869E-01	0,000E+00	1,596E-04
	DMEM	522.500	125.000	12.800.000	69.450	40.350.000	39,99	4.290.000	2,392E-01	2,450E+01	1,329E-01	7,722E+01	9,766E-03	5,426E-03
	Mini	198.000	12.035	885.000	6.955	36.150.000	0,00	3.370.000	6,078E-02	4,470E+00	3,513E-02	1,826E+02	1,360E-02	7,859E-03
M5	NP	34.100	0	875.000	339	40.550	-	-	0,000E+00	2,566E+01	9,941E-03	1,189E+00	0,000E+00	3,874E-04
	DMEM	917.500	2.240	14.100.000	14.650	20.800.000	0,00	2.380.000	2,441E-03	1,537E+01	1,597E-02	2,267E+01	1,589E-04	1,039E-03
	Mini	314.500	458	1.470.000	2.850	33.250.000	0,00	1.790.000	1,456E-03	4,674E+00	9,062E-03	1,057E+02	3,116E-04	1,939E-03
M6	NP	300.000	123.000	5.960.000	45.050	47.750	-	-	4,100E-01	1,987E+01	1,502E-01	1,592E-01	2,064E-02	7,559E-03
	DMEM	362.500	126.250	5.805.000	154.000	16.800.000	69,53	3.920.000	3,483E-01	1,601E+01	4,248E-01	4,634E+01	2,175E-02	2,653E-02
	Mini	143.500	10.710	1.350.000	33.850	15.250.000	15,63	2.480.000	7,463E-02	9,408E+00	2,359E-01	1,063E+02	7,933E-03	2,507E-02
M7	NP	103.300	1.828	125.000	0	418.000	-	-	1,770E-02	1,210E+00	0,000E+00	4,046E+00	1,462E-02	0,000E+00
	DMEM	3.250.000	115.000	9.145.000	145.000	70.700.000	0,00	3.560.000	3,538E-02	2,814E+00	4,462E-02	2,175E+01	1,258E-02	1,586E-02
	Mini	1.190.000	19.950	851.000	17.450	61.300.000	0,00	2.430.000	1,676E-02	7,151E-01	1,466E-02	5,151E+01	2,344E-02	2,051E-02
M8	NP	152.000	13.345	4.275.000	14.965	123.500	-	-	8,780E-02	2,813E+01	9,845E-02	8,125E-01	3,122E-03	3,501E-03
	DMEM	2.080.000	844.500	28.800.000	400.500	37.850.000	127,48	2.980.000	4,060E-01	1,385E+01	1,925E-01	1,820E+01	2,932E-02	1,391E-02
	Mini	672.000	240.500	6.900.000	79.100	25.250.000	75,34	2.670.000	3,579E-01	1,027E+01	1,177E-01	3,757E+01	3,486E-02	1,146E-02

Anhang 11: Bestandteile ausgewählter Zellkulturmedien

Medienbestandteile	<u>DMEM/F-12,</u> <u>Ca²⁺-frei</u>	<u>DMEM/F-12,</u> <u>Ca²⁺-haltig</u>	<u>DMEM</u> <u>(Standard)</u>	<u>DMEM,</u> <u>Phenolrotfrei</u>	<u>Minimal</u>
<u>Herstellervermerk:</u>	Fa. US-Biological D 9800 und N 8543 je 50% (v/v)		Fa. Sigma-Aldrich D 5648 D 2902		
<u>Anorganische Salze:</u>					
Calciumchlorid		+	+	+	
Kupfersulfat	+	+			
Eisensulfat	+	+			
Eisennitrat	+	+	+	+	
Magnesiumchlorid	+	+			
Magnesiumsulfat	+	+	+	+	
Kaliumchlorid	+	+	+	+	
Natriumbikarbonat	+	+	+	+	+
Natriumchlorid	+	+	+	+	+
Natriumphosphat	+	+	+	+	+
Zinksulfat	+	+			
<u>Aminosäuren:</u>					
L-Alanin	+	+			
L-Arginin	+	+	+	+	
L-Aspartat	+	+			
L-Asparagin	+	+			
L-Cystein	+	+	+	+	
L-Glutamat	+	+			
L-Glutamin	+	+	+	+	
Glycin			+	+	
L-Histidin	+	+	+	+	
L-Isoleucin	+	+	+	+	
L-Leucin	+	+	+	+	
L-Lysin	+	+	+	+	
L-Methionin	+	+	+	+	
L-Phenylalanin	+	+	+	+	
L-Prolin	+	+			
L-Serin	+	+	+	+	
L-Threonin	+	+	+	+	
L-Tryptophan	+	+	+	+	
L-Tyrosin	+	+	+	+	
L-Valin	+	+	+	+	

<u>Medienbestandteile</u>	<u>DMEM/F-12,</u> <u>Ca²⁺-frei</u>	<u>DMEM/F-12,</u> <u>Ca²⁺-haltig</u>	<u>DMEM</u> <u>(Standard)</u>	<u>DMEM,</u> <u>Phenolrotfrei</u>	<u>Minimal</u>
<u>Vitamine:</u>					
D-Biotin	+	+			
Cholinchlorid	+	+	+	+	
Folsäure	+	+	+	+	
Myo-Inositol	+	+	+	+	
Niacinamid	+	+	+	+	
D-Pantothensäure	+	+	+	+	
Pyridoxal	+	+	+	+	
Pyridoxin	+	+			
Riboflavin	+	+	+	+	
Thiamin	+	+	+	+	
Vitamin B-12	+	+			
<u>Andere Bestandteile:</u>					
D-Glukose	+	+	+	+	+
Hypoxanthin	+	+			
Linolensäure	+	+			
Putrescin	+	+			
Pyruvat	+	+		+	
Phenolrot	+	+	+		
Thioctat	+	+			
Thymidin	+	+			
Hyaluronsäure* (1 mg/ml)			(+)		
Hochreines Wasser	+	+	+	+	+

- **dunkel** hervorgehobene Felder markieren Ergänzungen der kommerziell erhältlichen Medien
- * für den Vergleich von Standardmedium (DMEM) und Standardmedium mit Zusatz von Hyaluronsäure

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. rer. nat. R.W. Kinne

PD Dr. rer. nat. J.A. Mollenhauer,

PD Dr. rer. nat. O. Pullig

Dr. rer. nat. Anke Rüttger

Frau J. Schömburg

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Greifswald, 21. Juni 2008

Alexander Brodhun, Verfasser

Lebenslauf

12. April 1980	Brodhun, Alexander geboren in Jena
1986 – 1991	Grundschule, POS „Herbert Liebs“, Neuenhof
1991 – 1999	Ernst-Abbe-Gymnasium, Eisenach
1996 – 1997	Waverly-Shell Rock Highschool, Waverly, Iowa, USA
1999	Abschluss: Abitur
1999 – 2000	Grundwehrdienst (2./Fallschirmjägerbataillon 261, Lebach)
2000 – 2007	Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena
Oktober 2007	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Abschluss: Staatsexamen
seit Februar 2008	Weiterbildungsassistent Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Universitätsklinikum Greifswald

Greifswald, den 21. Juni 2008

Alexander Brodhun

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. R.A. Venbrocks, Direktor des Waldkrankenhauses Rudolf Elle, Klinik für Orthopädie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas und sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn PD Dr. rer. nat. J.A. Mollenhauer danke ich für die Einführung in die Problematik, die sachkundige Betreuung im Verlauf der Arbeit und seine kompetente Unterstützung bei der Erstellung des Manuskriptes.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. rer. nat. R.W. Kinne sowie Herrn PD Dr. rer. nat. O. Pullig für die konstruktive, kritische Durchsicht des Manuskriptes und ihre geduldige Hilfe bei der Feinabstimmung.

Herrn Dr. med. Ilmars Stonans danke ich für die Einführung in die zellbiologischen und biochemischen Verfahren, für hilfreiche Tipps im Laboralltag und viel Humor im Freitag-feierabendstau.

Mein ganz besonderer Dank geht an Andrea, Anke, Cordula, Jana, Jana und Steffi! Ich danke Euch für Eure Hilfe bei der Manuskripterstellung, im Umgang mit der Software, für zahlreiche Tipps auf und abseits des Promotionsspielfelds, für heitere Stunden bei Bowling und Ouzo und den hin und wieder nötigen sprichwörtlichen „Tritt in den Allerwertesten“. Ich vermisse Euch!

Mein letzter und wichtigster Dank geht an meine Familie und meine Freunde für Rückhalt, Unterstützung und Zuspruch in allen Lebenslagen! Ihr seid Spitze!